MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI

I microbi sono molto importanti nelle attività dell'uomo:

- alimenti: i micro possono attuare sia azioni positive che negative sugli alimenti. Vi sono, per esempio, alimenti che non potrebbero essere prodotti senza l'azione dei micro, come i prodotti fermentali quali formaggio, birra, vino, salame.
- agricoltura: i micro sono importanti per il ciclo dell'azoto (attuano azotofissazione), per il ciclo dello zolfo e in quanto rendono nuovamente disponibili gli elementi che costituiscono le macromolecole andando a degradare la sostanza in decomposizione (attuato dai funghi). Svolgono un ruolo importante anche per i ruminanti: i batteri presenti nel loro stomaco sono infatti in grado di degradare la cellulosa fonte di energia per l'animale, in quanto costituita da glucosio, ma che non può essere degradata direttamente dall'animale. Questi microbi in grado di degradare la cellulosa sono molto studiati poiché forniscono glucosio che, se viene degradato dai lieviti, può dare bioetanolo (= biocarburante).
- ambiente: i micro sono importanti in quanto possono essere utilizzati per produrre biocarburanti ma sono importanti anche poiché attuano bioremediation = biorisanamento, cioè sono in grado di ricavare energia dalla degradazione di sostanze inquinanti (es: petrolio) producendo sostanze non inquinanti.
- biotecnologie
- malattie

microbiologia: disciplina giovane (a partire dalla seconda metà del 800 con Pasteur) che ha avuto un enorme sviluppo e che oggi può essere suddivisa in diverse branchie:

- medica
- immunologica
- microbiologia acquatica: legata all'ambiente marino
- ecologia microbica: studio dell'ambiente in cui vivono i micro
- sistematica microbica: classificazione dei micro
- fisiologia microbica: come funzionano i micro
- genetica batterica
- biologia molecolare: studia il funzionamento della vita a livello molecolare
- biotecnologie
- microbiologia degli alimenti: divisa in lattiero casearia (dairy microbiology) e viticola (wine microbiology)

All'inizio del 1900 le principali cause di morte (influenza, tubercolosi e gastroenterite) erano dovute a infezioni microbiche, in particolare infezioni batteriche poiché ancora non vi erano gli antibiotici, inventati solamente negli anni 50-60 dopo la II° guerra mondiale. Oggi invece le principali cause di morte sono dovute ad infezioni di virus

D: microrganismi: entità biologiche non visibili all'occhio umano nudo

Non li si possono definire esseri viventi in quanto per esserlo bisogna avere:

- capacità di metabolismo

Serie di reazioni chimiche e biochimiche di trasformazione che permettono di ricavare elementi ed energia da molecole esterne (= catabolismo) e con questi elementi andare a costituire nuove molecole (= anabolismo).

- capacità di riproduzione autonoma

Capacità di perpetuare la propria specie generando della prole.

Poiché i virus, che sono micro, non presentano nessuna di queste due caratteristiche allora non li posso definire esseri viventi. Per comprendere allora tutti i micro nella definizione si parlerà di "entità biologiche".

Vi sono altre caratteristiche tipiche degli organismi che però non sono essenziali per definire un essere vivente. Queste sono:

- capacità di differenziazione

Quando un organismo nasce risulta formato da una sola cellula. Per alcuni però col tempo il numero di cellule cresce e queste vanno ad esprimere in modo diverso le informazioni che possiedono, vanno cioè a specializzarsi. Per i batteri, costituiti da una sola cellula, la differenziazione è limitata e la si ha solamente con la formazione dell'endospora, struttura con forma diversa da quella della cellula vegetativa.

- evoluzione

Capacità degli esseri viventi ad adattarsi a cambiamenti ambientali nel lungo periodo. Questo avviene grazie a mutazioni del genoma, che risultano casuali e che possono comportare caratteristiche più favorevoli per l'organismo

- capacità di comunicare

I micro comunicano attraverso segnali chimici: ogni micro manda all'esterno molecole particolari, tipiche di quel micro, e queste si disperdono nell'ambiente entrando in contatto con gli altri micro. Più molecole segnale urtano il micro più altri micro vi sono nell'ambiente e il loro numero risulta proprio proporzionale al n° di urti che la cellula percepisce. Questo regola alcune funzioni metaboliche del micro così che esso vada a produrre solamente le sostanze che servono. In particolare regola le attività che la cellula non può attuare da sola e queste si attivano al raggiungimento del quorum sensing: quando i segnali percepiti superano la soglia minima, il micro attua la particolare attività.

- capacità di movimento

Capacità di spostarsi AUTONOMAMENTE. Si distinguono 3 categorie:
- mobili: si spostano autonomamente
- non mobili: si lasciano spostare
- immobili: non si possono spostare

Quando l'evoluzione trova qualcosa che non serve la elimina, quindi se fosse più vantaggioso muoversi, gli organismi che non si muovono si sarebbero estinti. In realtà vi sono molti più organismi che non si muovono quindi risulta più vantaggioso stare fermi. Il movimento risulta necessario per la ricerca del nutrimento per sopravvivere.

Tutti gli esseri viventi funzionano secondo il dogma centrale della biologia: le informazioni contenute nel DNA subiscono due processi:

1. TRASCRIZIONE

Ogni filamento viene trascritto in un filamento di mRNA ad opera della DNA-polimerasi.

2. TRADUZIONE

Il filamento di mRNA viene tradotto in una sequenza di amminoacidi considerando triplette di basi azotate (codoni) a cui si associa un tRNA che trasporta l'ammino codificato da quella tripletta. Il tutto avviene nel citoplasma grazie all'azione dei ribosomi.

D: microbiologia degli alimenti: scienza che studia la presenza e l'azione dei micro in ambito alimentare.

se i micro sono presenti o no. E' sia un dato qualitativo che quantitativo.

esprime il n° effettivo di micro presenti e viene espresso come **UFC** - unità formanti colonie.

con colonia si intende un insieme di micro che sono geneticamente identici tra loro in quanto generati a partire da 1 solo micro che si è riprodotto asessualmente. Fenotipicamente, invece, i micro possono essere come no uguali. Non scriviamo però "cellule formanti colonie" in quanto non siamo sicuri che la colonia sia stata formata da un solo organismo: inizialmente, infatti, x es si potevano avere due colonie separate che poi si sono unite a formarne una sola colonia e questa risulta allora formata a partire da 2 cellule, non da una. Questo avviene n[1] quando le cellule vivono unite, come per esempio gli stafilococchi. Allora si parla di "unità" formanti colonie. UFC espresso in base alla unità di volume o all'unità di peso ma poiché si tratta di n° grandi si scrivono sempre come un numero prima della virgola, un solo numero dopo e la potenza da 10 corrispondente.

Es: 12630 ⟶ $1,3 \cdot 10^4$

i micro possono agire sull'alimento, sul consumatore e su entrambi e possono fare questo sia in modo positivo che negativo.

In base alla loro attività si può suddividere i micro in:

a. micro buoni

Attuano attività positive e possono essere divisi in 3 categorie:

- necessari: indispensabili per un determinato processo (es: produzione formaggio)
- utile: la loro presenza dà particolari caratteristiche all'alimento (es: muffa in gorgonzola)
- probiotici: micro che non interagiscono con l'alimento ma che sono inseriti poiché favoriscono il corretto funzionamento dell'attività nel nostro organismo, n# l'attività della flora intestinale

b. micro dannosi

Attuano attività negative e possono essere divisi in 2 categorie:

- micro che causano alterazioni del prodotto (food spoilage)
- micro che causano avvelenamento da cibo (food poisoning). Questi sono detti patogeni e vanno ad agire sulla salute del consumatore.

Non vi possono essere micro che attuano entrambe le azioni: i primi infatti, si manifestano con alterazioni del cibo, i secondi invece non si fanno notare sul prodotto e proprio per questi due diversi comportamenti i micro non possono appartenere a entrambe le categorie.
Per legge è vietata la vendita di prodotti che presentano patogeni quindi per eliminarli si utilizza il trattamento di pastorizzazione.
Questo trattamento non elimina però i micro alteranti, che rimangono, in quanto per fare ciò servono T più elevate (ottenute con U.H.T.).
Si attua allora o pastorizzazione o UHT perché ci sono ≠ tipi di consumatore: quello che può andare spesso a prendere prodotto (allora lo prende pastorizzato perché più vicino al prodotto e anche se dura meno ha tempo per andare a prenderlo) e quello che può andarlo a prendere meno spesso (prende UHT che anche se è + distante dal prodotto originario dura di più).

c. micro indifferenti

Micro che non interagisce direttamente con gli alimenti ma che sono sfruttati in quanto producono sostanze utilizzate negli alimenti (es: glutammato, amminoacido usato come esaltatore di sapidità)

D: biotecnologie: processi tecnologici che utilizzano organismi viventi per l'ottenimento di un prodotto. Alimenti prodotti in questo modo sono formaggio, grappa, vino e queste biotecnologie, dette di I° generazione, hanno un impatto positivo sul consumatore. Negli ultimi anni questo settore si è molto accresciuto e si è arrivati a biotecnologie di II° generazione (selezionano i micro più adatti per i processi) e biotecnologie di III° generazione (costruiscono attraverso l'ingegneria genetica i microbi più adatti) che risultano però meno gradite al consumatore, nd per l'aspetto delle modificazioni genetiche e degli OGM ottenuti.

I principali gruppi microbici sono:

- batteri
- funghi: importanti nel settore alimentare sono lieviti e muffe
- elminti: vermi
- protozoi
- virus e batteriofagi (virus che attaccano i batteri)

Le diverse categorie di alimenti sono invece:

1- alimenti di origine vegetale
Provenienti dal suolo, come cereali, farine, frutta e verdura

2- alimenti di origine animale
Carne, pesce e prodotti di animali (latte, uova)

3- prodotti fermentati o trasformati per intervento di micro
Aceto, formaggi, pane, insaccati, vino, birra, caffè, the, cacao

4- alimenti "speciali"
Alimenti che subiscono particolari processi, lavorazioni. Esempi sono gelati, emulsioni, gasate

5- alimenti etnici
Alimenti tipici di certe popolazioni

6- alimenti etici
Alimenti prodotti secondo procedure stabilite dalla religione

7- alimenti transgenici
OGM, nd mais, soia e loro derivati.

- MORFOLOGIA e DIMENSIONI -

I micro hanno una dimensione dell'ordine dei µm (10^{-6}m): per i batteri a forma sferica (=cocco) il diametro può risultare di 1 µm, per i batteri a forma bastoncellare si arriva a 2-3 µm. Queste dimensioni possono comunque essere maggiori, dipende tutto dal micro che si considera. Sicuramente le cellule eucarioti risultano più grandi ma non di molto (2-200 µm).
Se considero una cellula come una sfera, all'aumentare del raggio R aumentano anche la superficie e il volume, solamente che la superficie aumenta in ragione del quadrato di R (infatti $A = 4\pi R^2$) mentre il volume aumenta in ragione del cubo di R (infatti $V = 4/3 \pi R^3$).
Di conseguenza il volume cresce più velocemente e quindi il rapporto tra la superficie e il volume diminuisce sempre più: si avrà allora sempre meno superficie a disposizione per unità di volume quindi gli scambi saranno meno efficienti e tempo ed energia necessari a spostare le sostanze dalla superficie al centro, e viceversa, saranno maggiori. Da ciò si può concludere che le cellule di dimensioni minori risultano più efficienti e questo spiega come in alcuni ambienti lo sviluppo dei micro risulta maggiore rispetto a quello di organismi più grandi.
Per quanto riguarda la morfologia, si distinguono le diverse forme di micro:

a- cocco o sferica (in italiano cocco-cocchi, in inglese coccus-cocci (cocciai)) } + imp.
b- bacillo o bastoncello (in italiano bacillo-bacilli, in inglese bacillus-bacilli o rod) }
c- vibrioni: curvi a virgola
d- spirilli: forma attorcigliata
e- aggregazioni: vi sono dei casi in cui quando il batterio si replica, la cellula figlia non si stacca completamente ma rimane attaccata attraverso la parete. Non si va a formare un individuo pluricellulare, in quanto la cellula madre e la figlia presentano le due membrane separate e quindi due ambienti citoplasmatici diversi, ma si formano degli aggregati che sono tipici di determinate tipologie batteri che.
  I diversi aggregati che si possono formare, sia tra cocchi che tra bacilli, sono:
  - diplococchi: due cellule unite
  - tetradi: quattro cellule unite
  - coccobacilli: forma intermedia tra un cocco e un bacillo
  - streptococchi: catenelle di cocchi formatisi in quanto la riproduzione avviene in una unica direzione, su di un unico piano.
  - stafilococchi: aggregati casuali dove la riproduzione avviene in ogni direzione

N.B. Se scrivo "Streptococcus" o "Bacillus", indico un genere batterico che ha una struttura a catenella o bastoncellare. Se scrivo invece "streptococchi" o "bacilli" indico in modo generale la morfologia a catenella o a bastoncello!!

N.B. Non tutti i batteri che hanno una struttura a catenella sono definiti "Streptococcus" e questo vale per qualsiasi morfologia!! Dicendo "Streptococcus" indico si batteri con forma a catenella ma non è detto che a tutti i batteri che presentano questa forma sia stato dato questo nome!!

pleomorfismo: la coltura può presentare in certe condizioni una morfologia diversa. Questo può dipendere dalle sostanze nutritive che sono a disposizione (se vi è abbondanza le dimensioni aumentano) e dall'invecchiamento, che può comportare una non sincronia tra l'allungamento della cellula e la divisione in due cellule durante la riproduzione. Le forme dei micro possono quindi variare nel tempo!!

Il successo dei batteri è dovuto soprattutto alle loro dimensioni. Ciò che infatti noi non vediamo per noi non esiste quindi pensiamo che non vi siano micro. In realtà se si osserva al microscopio una punta d'ago si possono riscontrare migliaia di batteri!!

Negli alimenti noi dobbiamo mirare ad ottenere la sterilità:

quando non vi sono micro vivi nel prodotto. La sterilità risulta ottenibile in due modi:

- uccidendo tutti i micro presenti applicando trattamenti microbicidi che sfruttano T elevate, radiazioni o sostanze chimiche;
- eliminando fisicamente i micro dal prodotto attraverso un processo di filtrazione. Questo processo non è però applicabile a tutti gli alimenti ma solamente a quelli liquidi. I filtri utilizzati possono avere pori di dimensioni 0,45 µm (dimensione media più grande) oppure 0,22 µm (mi attuano un processo più sicuro ma non sono utilizzati spesso poiché sono più lenti e hanno più probabilità di intasarsi)

vivo = ha metabolismo attivo

morto = cessazione irreversibile delle attività metaboliche

vitale = in grado di riprodursi

spora = viva ma NON vitale

Differenze tra eucarioti e procarioti

Carattere	Cellule procarioti	Cellule eucarioti
Gruppi, dove trovati, come unità di struttura	batteri, alghe azzurre	alghe, funghi, protozoi, piante e animali
Intervallo di dimensioni dell'organismo	1-2 µm per i-4 µm o meno minori (vedi pagine prima)	maggiori di 5 µm in larghezza o diametro maggiori
Sistema genetico		
Posizione	nucleoide, corpo cromatinico o materiale nucleare	nucleo, mitocondri, cloroplasti
Struttura del nucleo	non delimitato da una membrana nucleare	delimitato da una membrana nucleare
	un cromosoma circolare	uno o più cromosomi lineari
	il cromosoma non contiene istoni	i cromosomi contengono istoni
	assenza della divisione mitotica	divisione nucleare mitotica
	nucleo assente	nucleo presente
	i geni funzionalmente affini possono essere raggruppati	i geni funzionalmente affini non sono raggruppati
Sessualità	lo zigote è di natura merozigotica (diploide parziale)	lo zigote è diploide
Natura e strutture citoplasmatiche	NON ha organelli	ha organelli
Corrente citoplasmatica	assente	presente
Pinocitosi	assente	presente
Vacuoli gassosi	possono essere presenti	assenti
Mesosoma	presente	assente
Ribosomi	70s distribuiti nel citoplasma	80s distribuiti su membrane come nel reticolo endoplasmico; 70s nei mitocondri e nei cloroplasti
Mitocondri	assenti	presenti
Cloroplasti	assenti	possono essere presenti
Strutture di Golgi	assenti	presenti
Reticolo endoplasmatico	assente	presente
Vacuoli (veri) delimitati da membrana	assenti	presenti

D: organelli: strutture circondate da membrana

Sono nati da cellule procariote che sono state inglobate da una cellula eucariote. Questo avviene saltuariamente solamente che per qualche mutazione il procariote inglobato non risulta degradabile e quindi permane nel citoplasma della cellula eucariote. Col tempo questi procarioti si sono specializzati e hanno assunto le diverse funzioni dei vari organelli.

Le principali strutture presenti nella cellula microbica sono:

Ⓐ **membrana citoplasmatica** [vedi costruzione in microbiologia]

Interfaccia della cellula tra l'interno e l'esterno che presenta tre funzioni:

- ancorare le proteine
- inserire canali per il trasporto. La membrana è una barriera permeabile che può essere attraversata per diffusione, o per trasporto attivo,
  - diffusione → la molecola stessa ha l'energia per passare, quindi la cellula non spende energia
  - trasporto attivo → la cellula impiega energia per il passaggio. Si distinguono diverse tipologie:
    - uniporto: faccio entrare una molecola
    - antiporto: faccio entrare una e uscire un'altra
    - simporto. faccio entrare contemporaneamente 2

  Le caratteristiche che permettono alle molecole di attraversare la membrana sono:
  - dimensioni: più una molecola è piccola più passa facilmente (es: ogni 1000 molecole di acqua che diffondono, ne diffondono 1 di glicerolo, più piccolo, e 0,01 di triptofano)
  - carica elettrica: gli ioni non entrano facilmente poiché questo sbilancerebbe la carica nella membrana e quindi scaricherebbe l'energia della cellula.
- sede della produzione di energia: nella faccia esterna della membrana si ha un eccesso di protoni H^+, mentre all'interno si ha una carenza. Questo permette di produrre una forza proton-motrice in quanto la differenza potenziale tra i due lati della membrana costituisce l'accumulatore di energia della cellula.
  Il gradiente di protoni è dovuto alla catena di trasporto degli elettroni che porta allo spostamento di ioni H^+ dall'interno all'esterno della cellula a seguito della ossidazione di sostanze quali NADH o FADH.

Ⓑ **parete cellulare** [vedi costruzione in microbiologia]

Nei batteri si distinguono due tipologie diverse di parete e questa differenza viene utilizzata per distinguere i batteri in due classi diverse con l'utilizzo della colorazione differenziale (poiché i batteri vi reagiscono in maniera diversa) di Gram. Essa utilizza:

- violetto di genziana: effettivo colorante che permette di distinguere i batteri
- soluzione di iodio-iodurata
- alcol
- safranina

I batteri si distinguono allora in:

- gram +: si colorano di blu

la parete è la struttura che mantiene la rigidità, la forma del batterio e a differenza della membrana risulta completamente permeabile. Vi è un ordinato e compatto strato di peptidoglicani in cui sono inseriti gli acidi teicoici (affondano fino a metà parete) e gli acidi lipoteicoici (affondano fino alla membrana citoplasmatica) che rendono ancora più organizzata la struttura. La parete è un buon strato di protezione quindi permette una maggior resistenza hai gram + (per es. contro la pressione osmotica).

- gram -: si colorano di rosso

la parete è costituita da un sottile strato di peptidoglicani con sopra una membrana costituita da fosfolipidi in doppio strato e lipopolisaccaridi (**LPS**)

→ risultano costituiti da una parte lipidica e da una parte polisaccaridica

→ (parte lipidica) ancorata allo strato fosfolipidico della membrana esterna attraverso molecole idrofobiche e viene detta lipide A. Questa parte ha un'azione tossica per il nostro organismo quando arriva a livello dell'intestino e si parla di endotossine: costituenti normali delle membrane esterne dei gram - che quando si staccano (se vengono cambiati o se la cellula muore) possono dare dei problemi. È importante allora sapere se un micro è gram + o gram -, per sapere se può rilasciare queste tossine.

→ (parte polisaccaridica) sporge all'esterno e risulta costituita da diversi zuccheri. Questi sono in parte costanti per tutti i gram - (parte detta core) mentre la parte più esterna varia in base al micro considerato.

Questa struttura ha una funzione immunologica = serve per generare una risposta immunologica = risposta che si ha quando un antigene incontra gli anticorpi.

→ (antigene) sostanza che quando arriva nel circolo sanguigno stimola la produzione di anticorpi. Non tutte le molecole che entra nel sangue hanno funzione antigenica !!

→ (anticorpi) risposta del nostro organismo quando si ha un attacco esterno. Sono gamma globuline = proteine prodotte da det. cellule che rendono inoffensivo l'antigene.

- METABOLISMO -

nutrizione : azione che permette di importare all'interno dell'organismo sostanze di cui ha bisogno. Le sostanze importate possono essere di due categorie:

- sostanze che forniscono energia : quelle più importanti
- sostanze che compongono i costituenti base.

metabolismo : insieme di reazioni biochimiche che avvengono nell'organismo e che sono catalizzate n^{te} da enzimi. Si distinguono due diverse azioni:

- catabolismo: funzioni legate alla produzione di energia. Dalle molecole energetiche importate si ricava energia e poi si espellono i rifiuti. Si osserva che la massa che entra è pari alla massa in uscita, viene solo ricavata l'energia e infatti $\Delta G < 0$ = genera energia
- anabolismo: la cellula utilizza l'energia ricavata dal catabolismo e i costituenti base importanti per costruire parti di essa o di cellule figlie. $\Delta G > 0$

Ogni metabolismo gestisce in modo diverso i seguenti aspetti:

- fonte di carbonio

Si distingue in autotrofi (ricavano carbonio da CO_2) ed eterotrofi (utilizza molecole organiche).

- fonte di energia

L'unica fonte di energia sulla Terra è il Sole e gli organismi possono utilizzare questa energia in modo diretto (fototrofi) o in modo indiretto (organismi non in grado di usare l'energia direttamente ma questa deve essere trasformata in energia biochimica, cioè in sostanze chimiche che possono poi essere utilizzate da questi organismi detti chemiotrofi).

I chemiotrofi possono ricavare energia dalle molecole attraverso due processi diversi:

a. respirazione

più completa e più diffusa

b. fermentazione

Si svolge in condizioni particolari che dipendono dalla conformazione genetica dell'organismo o dalla situazione ambientale. È quindi un modo alternativo di ricavare energia dalle molecole che risulta però meno efficiente.

N.B. i due processi differiscono per l'accettore di elettroni finale

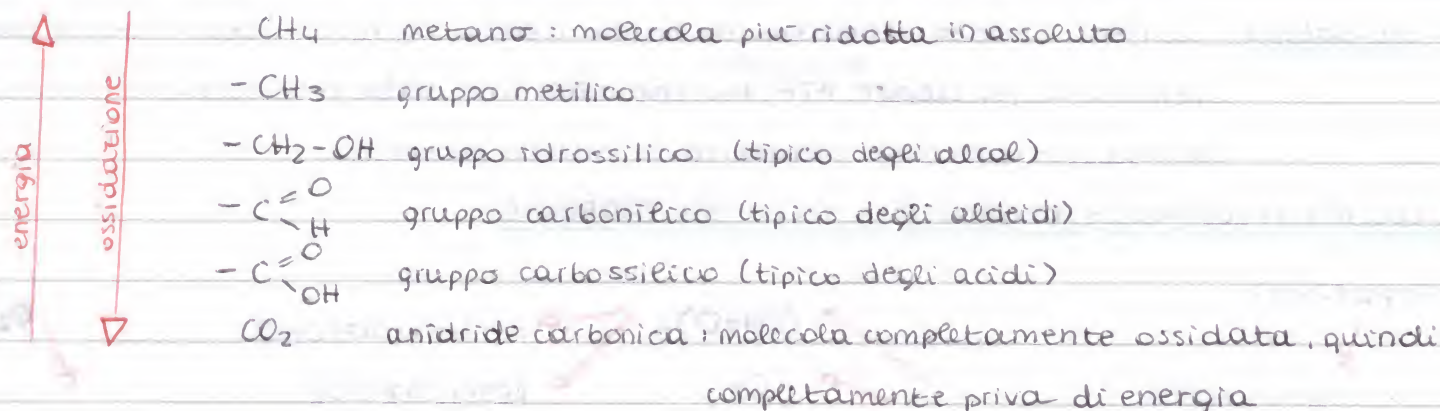
– donatore di elettroni

l'energia nelle molecole si conserva nel livello di riduzione = n° di elettroni presenti negli orbitali. Una molecola energetica è allora **SEMPRE** una molecola ridotta e con le reazioni di ossidazione che avvengono nella respirazione o nella fermentazione l'energia viene liberata. Si distinguono due diversi tipi di molecole energetiche:

- organiche: contenenti carbonio. Gli organismi che le usano sono detti chemiorganotrofi
- inorganiche: utilizzate da chemiolitotrofi

Per sapere se una molecola è energetica si deve osservare il livello di riduzione: poiché quando una molecola si riduce acquisisce $1e^-$ spesso a questo elettrone è unito un protone (x motivi stabilità) e quindi riducendosi la molecola acquisisce $1e^- + 1$ protone = 1 atomo di H. Per vedere il livello di riduzione basta allora osservare il n° di H legati al carbonio.

(energia ↑ / ossidazione ↓)

CH_4	metano: molecola più ridotta in assoluto
$-CH_3$	gruppo metilico
$-CH_2-OH$	gruppo idrossilico (tipico degli alcol)
$-C{=O \atop \diagdown H}$	gruppo carbonilico (tipico degli aldeidi)
$-C{=O \atop \diagdown OH}$	gruppo carbossilico (tipico degli acidi)
CO_2	anidride carbonica: molecola completamente ossidata, quindi completamente priva di energia

Nel processo energetico l'energia può essere spremuta completamente dalla molecola oppure in modo parziale, in base al diverso metabolismo che presentano gli organismi.

– accettore di elettroni

Anch'esso è importante poiché tanto più l'accettore ha la tendenza ad acquisire elettroni (tanto più tende ad ridursi) tanto più energia viene liberata dalla molecola. L'ossigeno è il miglior accettore e quindi si preferirebbe usare sempre questo ma esso non è però sempre presente e quindi si utilizzano altri accettori finali (è ciò che fanno i lieviti che quando c'è ossigeno respirano, quando non c'è fermentano) quando ciò è possibile (noi non possiamo farlo: o c'è O_2 o moriamo). Proprio perché la respirazione usa come accettore l'ossigeno (accettore ESTERNO) essa è più efficiente e libera più energia. La fermentazione usa invece un accettore INTERNO, il piruvato, e questo ha una minor capacità riduttiva quindi riesce a liberare meno energia e di conseguenza la fermentazione risulta meno efficiente.

L'energia ricavata dal metabolismo viene immagazinata sulle membrane, che vanno così a costituire gli accumulatori energetici della cellula.

- membrana citoplasmatica nei procarioti,
- membrane dei mitocondri negli eucarioti.

La molecola utilizzata per il trasporto di energia e come fonte spendibile di energia è l'ATP, che racchiude l'energia nei legami con i gruppi fosfati. Questi gruppi presentano infatti uguale carica negativa perciò dovrebbero respingersi ma nell'ATP vengono associati e tenuti insieme. Quando si va allora a rompere un legame tra questi gruppi si va a liberare energia.

L'aggiunta di un gruppo fosfato H_3PO_4 è definita fosforilazione e ve ne sono due tipi:

1. a livello del substrato: avviene sia con la respirazione che con la fermentazione e consiste nel utilizzare subito l'energia ricavata da 1 substrato per produrre ATP
2. ossidativa: utilizza i processi ossidativi che hanno creato la forza moton-motrice nella membrana per creare ATP con ATP-asi. Avviene alla fine della respirazione e ciò spiega la maggior capacità energetica di questo processo.

CICLO DELLA SOSTANZA ORGANICA o CICLO DEL CARBONIO

energia (luce) → FOTOSINTESI → $(CH_2O)_n$, O_2 → FERMENTAZIONE, RESPIRAZIONE ← O_2

FOTOSINTESI: L'energia viene racchiusa negli atomi di carbonio ricavati dalla CO_2 (molecola più ossidata e quindi con C più scarico). Il carbonio si riduce acquisendo e⁻ dall'ossigeno presente in H_2O, che si ossida. Si ricava allora una molecola energetica $(CH_2O)_n$, è uno zucchero n^H glucosio, e O_2 come scarto

RESPIRAZIONE: Gli organismi utilizzano la molecola energetica prodotta dalla fotosintesi per ricavare energia. Lo zucchero cede elettroni e l'accettore finale di questi e⁻ è O_2, che quindi si riduce a H_2O (espulsa con le urine e la sudorazione). Lo zucchero ossidato viene invece espulso in quanto scarto sotto forma di CO_2

H_2O, CO_2 → FOTOSINTESI

ENERGIA (ATP + calore)

la respirazione prevede diverse fasi:

A· glicolisi: processo comune con la fermentazione. Prevede di ricavare dal substrato (glucosio) 2 molecole di piruvato, 2 molecole di ATP e 2 di NADH.
le molecole di NAD^+ che si sono ridotte durante il processo acquisiscono energia e quindi sono loro che trasportano il potere riducente.

B· ciclo di krebs: le molecole di piruvato sono soggette ad una serie di reazioni che portano alla formazione di altro ATP (36) e altro NADH, producendo come prodotto di scarto CO_2 che verra' poi espulsa.

C· catena respiratoria: i NADH prodotti dalla glicolisi e dal ciclo di krebs si ossidano a NAD^+ cedendo i loro elettroni a molecole presenti sulla membrana (citoplasmatica nei micro, mitocondriale in eucarioti). Gli elettroni passano da molecola in molecola, permettendo così la formazione della forza moton-motrice (poiché sono espulsi all'esterno H^+), fino ad arrivare all'accettore finale, O_2, che si riduce a H_2O.

Nella fermentazione si ha solamente la fase di glicolisi e si presenta quindi il problema di dover ossidare il NADH prodotto, per poterlo nuovamente rendere disponibile al processo. L'acido piruvico viene allora utilizzato come accettore di elettroni (era comunque uno scarto da eliminare quindi posso mettergli anche gli elettroni, tanto deve essere buttato ugualmente) e ciò permette di ossidare il NADH per renderlo nuovamente disponibile nella glicolisi.

Vi sono diversi tipi di fermentazione, ma quelle più importanti sono:

- lattica: gli elettroni del NADH si attaccano al secondo carbonio dell'acido piruvico per formare acido lattico;
- alcolica: l'acido piruvico viene decarbossilato ad acetaldeide e questa funge da accettore di elettroni per formare alcol etilico.

Si osserva allora che la fermentazione produce energia solamente nella fase iniziale di glicolisi, ma le fasi successive sono comunque fondamentali in quanto permettono di rigenerare NAD^+, fondamentale affinché avvenga la glicolisi.

Riassumendo: differenze tra respirazione e fermentazione

FERMENTAZIONE

- **assenza** di un accettore di elettroni esterno
- molecole **organiche** come accettori di elettroni
- ATP **solo** via fosforilazione a livello di substrato
- molecole **organiche** come donatori di elettroni (carboidrati, alcuni aminoacidi e acidi organici)
- luce non necessaria
- resa **modesta (2 ATP)**
- assenza di catena di trasportatori di elettroni

RESPIRAZIONE

- **presenza** di un accettore di elettroni esterno
- molecole **inorganiche** come accettori di elettroni (di norma)
  - Respirazione **AEROBICA** (O_2)
  - Respirazione **ANAEROBICA** (NO_3^-, $SO_4^=$, CO_2)
- ATP via
  - fosforilazione a livello di substrato
  - fosforilazione ossidativa (uso della PMF)
- molecole **organiche** o **inorganiche** come donatori di elettroni
- luce non necessaria
- resa **elevata (38 ATP)**
- presenza di catena di trasportatori di elettroni

ENDOSPORE

Strutture di soprawivenza costruite dentro la cellula vegetativa. Sono esclusive dei BATTERI !! Queste endospore nella cellula possono essere:

- centrali: al centro della cellula
- sub-apicali: verso una estremità
- apicali: completamente ad una estremità

I generi di micro importanti nella microbiologia agro-alimentare che formano endospore sn:

- Bacillus: le endospore tendono ad essere centrali (nᵗ Bacillus cereus)
- Clostridium: le endospore tendono ad essere apicali o subapicali (nᵗ C. botulinum)

I micro di questi due generi hanno in comune il loro ambiente, il SUOLO, che risulta sempre in emergenza continua e perciò si necessita di strutture di soprawivenza. Nel suolo, infatti:

> si ha un grandissimo affollamento di micro e di altri organismi quindi si deve attuare una lotta per la soprawivenza e si ha sempre una forte concorrenza, nᵗ per il cibo.

> ci possono essere variazioni molto rapide delle condizioni ambientali, nᵗ sulla superficie.

> si può avere variazione del potenziale redox (= variazione O_2 nel terreno).

Il metabolismo delle endospore è praticamente nullo e per questo possono soprawivere per moltissimo tempo (teoricamente per sempre). L'unica funzione mantenuta attiva è la capacità di percepire variazioni nell'ambiente esterno.

Il tempo di sporulazione è molto breve (~ 8 ore nel Bacillus) ed è regolato da meccanismi di "quorum sensing" = in base alle condizioni ambientali esterne che vengono percepite.

La formazione della endospora awiene in diverse fasi:

1. la cellula duplica il suo DNA
2. le due copie sono portate agli estremi opposti della cellula
3. la membrana si restringe per dividere il citoplasma. Fino a qui la cellula attua le stesse fasi che awengono nella riproduzione, nella formazione di cellule figlie, ma vi è però una differenza: il citoplasma non viene diviso equamente ma si ha una parte più grande e una più piccola e sarà proprio da quest'ultima che avrà origine la spora.
4. la cellula più grande fagocita la cellula più piccola e questo serve a dare un ulteriore strato protettivo al genoma. La spora presenta ora due membrane: quella interna e quella esterna.
5. si aggiungono altri strati protettivi e quando il processo è concluso la cellula vegetativa muore lasciando la spora

Gli strati presenti nella spora che proteggono il genoma sono:

a· esosporio: strato più esterno

b· cappotti: rivestimenti proteici costituiti da ammino inusuali (amino diversi da quelli che solitamente formano le proteine). Questi ammino sono molto importanti poiché difendono la spora dall'azione degli enzimi proteasi, enzimi che degradano le proteine per ricavare gli ammino di cui necessitano.

c· cortex: rivestimento costituito da peptidoglicani

d· core: è il citoplasma della cellula vegetativa ma con in più:

- acido dipicolinico: risulta polimerizzato con ioni bivalenti di calcio e questo porta ad una gelificazione del citoplasma. Essendo allora più denso i movimenti saranno limitati e ciò rende più stabile il citoplasma.
- SASP: small acid soluble proteins, piccole proteine acido solubili che hanno una funzione istonosimile = simile a quella degli istoni = proteine strutturali che proteggono il DNA e lo tengono compatto. Oltre ad attuare ciò le SASP sono importanti in quanto sono la prima fonte di ammino per ricostruire la cellula vegetativa

Le differenze tra cellula vegetativa ed endospora sono allora:

caratteristiche	cellule vegetative	endospore
struttura	tipica dei gram +	a strati (vedi sopra)
apparenza al microscopio	non riflette	riflette
contenuto di calcio	poco presente	molto presente
contenuto di acido dipicolinico	assente	presente
attività enzimatica	alta	bassa o assente
metabolismo	alto	basso o assente
sintesi di macromolecole	presente	assente
mRNA (uno dei modi che si usa x misurare vitalità (=metabolismo) cellule)	presente	assente
DNA e ribosomi	presenti	presenti
resistenza al calore	bassa	alta
resistenza alle radiazioni (UV ultraviolette, che ha bersaglio distruzione DNA)	bassa	alta
resistenza ad agenti chimici	bassa	alta
colorabilità	si colora	non si colora (posso colorare con verde malachite. colorazione + aggressiva applicata a T elevate)
azione lisozima	sensibile	resistente
contenuto H_2O	alto (~80-90%)	scarso (~10-25%)
SASP	assenti	presenti

NON è sempre necessario eliminare le spore dagli alimenti !! Esse sono infatti micro dormienti e finché rimangono tali sono innocue. Per eliminarle posso comunque utilizzare diverse modalità:

Ⓐ liofilizzazione (freeze-drying)

Processo che prevede l'eliminazione di H_2O attraverso sublimazione (passaggio da solido a gas). Si nota che dopo 3 cicli di liofilizzazione, seguiti da reidratazione, si hanno ancora il 100% di spore!!!! mentre per eliminare il 98% delle cellule vegetative basta un ciclo. L'eliminazione delle spore è allora un problema perché più cicli attuo più aumentano i costi e più il prodotto si altera quindi devo pensare se effettivamente vale la pena di eliminare le spore.

Ⓑ trattamento con acqua ossigenata H_2O_2 (o perossido di idrogeno)

Molecola tossica che in 2,5 minuti uccide ~100% delle cellule vegetative, ma meno del 10% di spore. Per eliminare il 94% di spore serve un trattamento di 60 minuti !!.

Ⓒ trattamento con raggi UV

La dose per uccidere il 90% della popolazione è ~10 volte superiore per le endospore (315 J/m^2) rispetto alle cellule vegetative (40 J/m^2), perciò serve un trattamento molto più drastico. Oltre alla dose è importante la posizione del micro perché deve essere direttamente esposto al trattamento, i raggi devono colpirlo direttamente per eliminarlo.

Ⓓ trattamento con calore umido

Trattamento più utilizzato e più efficiente poiché l'acqua conduce molto più dell'aria.
Il parametro che misura la termoresistenza dei micro è **D** = tempo di riduzione decimale = tempo per eliminare il 90% dei micro. Per le cellule vegetative a 65 °C si ha una riduzione decimale in meno di 10 s, per uccidere invece il 90% delle spore alla stessa temperatura servono 105 h!!!! Questo comporta ovviamente spese elevatissime e profonde alterazioni del prodotto.
Per ridurre i tempi di riduzione decimale delle spore servono allora T più elevate, in particolare sopra i 100 °C e queste nell'acqua sono raggiungibili con l'utilizzo dell'autoclave, che varia P.
Si arriva a T = 121,1 °C per un trattamento in autoclave sotto pressione.

Ⓔ trattamento con calore secco

Il trattamento è uguale a quello applicato nel caso precedente solamente che qui si usa l'aria e poiché questa conduce molto meno dell'acqua, per ottenere gli stessi risultati del calore umido, servono tempi più lunghi.

I diversi passaggi che portano dalla spora alla cellula vegetativa sono:

1- attivazione: non conosciamo approfonditamente le cause che portano all'inizio di questo processo: la spora può per esempio attivare la trasformazione quando percepisce determinate molecole nutritive nell'ambiente ma può attivarlo anche per tanti altri motivi. Si è però sicuri che questa fase viene attivata quando la spora subisce un brusco cambio di T e qst T deve addirittura essere subletale (= vicino a T di morte). Questo è un problema poiché quando si attua un trattamento termico è possibile raggiungere questa T subletale quindi si va a favorire lo sviluppo delle spore !!!! Questo avviene n^{H} quando si attuano questi trattamenti in casa e da ciò derivano molte infezioni da C. botulinum.

2- germinazione: riparte il metabolismo. Vengono escreti i cationi (n^{H} Ca^{2+}), l'acido dipicolinico viene degradato (così il citoplasma diventa più fluido) ed espulso, le SASP sono degradate in quanto fonte primaria di ammino, viene assorbita H_2O per reidratare il citoplasma, il cortex viene degradato e inizia la sintesi di RNA e proteine.

3- crescita

efficace: attua l'effetto desiderato (= funziona)

efficiente: quanto migliore è un processo rispetto ad un altro nel raggiungere lo scopo, quale raggiunge lo stesso scopo con il minor dispendio.

- CLASSIFICAZIONE DEI MICRO -

D: classificare: individuare delle categorie e dei criteri per collegarle
I passaggi tipici di una classificazione sono:

A· caratterizzazione

Si sceglie un certo numero di caratteristiche, che possono essere sia fenotipiche che genotipiche, che mi permettono di distinguere gli organismi. le prime classificazioni attuate utilizzavano caratteri fenotipici ma oggi si utilizzano caratteri genotipici in quanto mi permettono di attuare una classificazione più profonda, più precisa. I caratteri possono essere di due tipi:

- qualitativi: forma della parete
- quantitativi: lunghezza della cellula

Oggi si utilizzano n## caratteri binari, in quanto si utilizza il computer per rielaborare i dati, e per convertire i caratteri qualitativi o quantitativi in binari si determinano dei limiti e si indica se il dato è sopra o sotto questo limite. (Es: forma della parete: è gram+? < SI / NO, lunghezza della cellula: è 10 µm < SI / NO).

B· sistematica

Gli organismi vengono uniti in gruppi e ciò può essere fatto in base alla somiglianza tra gli organismi (classificazione fenotipica) o in base alla parentela, alla somiglianza genetica (classificazione genotipica).

C· nomenclatura

Ad ogni gruppo viene dato un nome e questo è necessario per la comunicazione

D· identificazione

Si verifica se la classificazione attuata descrive effettivamente l'organismo.

Si distinguono allora due tipi di classificazione

- tassonomia: basata sulle somiglianze (sul fenotipo)
- filogenesi: basata sul genoma (sul genotipo)

la classificazione degli organismi si basa su queste categorie tassonomiche:

- dominio
- regno
- philum
- classe
- ordine

+ imp nei micro:

- famiglia
- genere
- specie

Vi sono poi categorie ancora minori, come sottospecie, serovar (≠ sierologica), biovar (≠ in base all'ambiente), fagovar (≠ in base ai virus che possono avere i batteri), patovar...

Ogni organismo vivente viene classificato in modo binario indicando genere e specie. Il genere può essere indicato da solo quando si vuole parlare in generale di quel tipo di organismi, mentre la specie non può **MAI** essere indicata da sola, in quanto organismi di generi diversi possono appartenere alla stessa specie !!

Si può scrivere anche in modo abbreviato, abbreviando il genere e mettendo per esteso la specie. Il genere va con la lettera maiuscola, la specie con la lettera minuscola.

Es: Escherichia coli   E. coli

N.B. Il nome dell'organismo è stabilito da chi lo scopre. Per esempio "Escherichia" deriva dal microbiologo tedesco Escherich che ha studiato questo micro, "coli" è invece un genitivo latino che indica il colon, luogo dove il micro è stato osservato.

↓

unica categoria che ha un significato biologico.

D: due individui appartengono alla stessa specie se sono in grado di riprodursi per via sessuata dando origine a progenie fertile

Nel caso dei micro vi sono però dei problemi:

> i batteri si riproducono per via ASESSUATA !!

> si hanno forti scambi orizzontali di DNA: spesso i micro inglobano nel loro DNA geni provenienti dall'esterno quindi non legati né con l'evoluzione né con l'ereditarietà. (si parla invece di scambi verticali per quanto riguarda i geni trasferiti da genitori ai figli) Questi geni inglobati possono dare caratteristiche molto diverse da quelle del genere e della specie a cui il micro appartiene.

> nei micro si ha una maggiore incidenza mutazionale poiché si riproducono molto spesso

> tra due micro che si assomigliano prima o dopo ne troverò uno con caratteristiche intermedie cosa che non avviene negli organismi superiori, più discontinui in quanto possono riprodursi solo con individui della stessa specie.

la definizione di specie cambia allora per i micro:

D: specie batterica : gruppo di ceppi che mostrano un grado elevato di somiglianza, fenotipica e genotipica a livello globale, che si distingue da altri gruppi di ceppi, correlati per un gran numero di caratteri indipendenti.(20-30)
ceppi ↓ equivale al concetto di singolo individuo

D: coltura pura : popolazione di micro generati per via assessuata da un solo micro. Tutti gli individui generati sono fenotipicamente diversi ma geneticamente uguali. la coltura pura può essere fatta in:

- liquido
- solido : la coltura pura su solido è detta colonia

Il micro che viene isolato e che da origine alla coltura pura è il CEPPO
Se il ceppo non corrisponde a nessuna specie già isolata allora si ha un ceppo tipo = individuo di riferamento per quella specie, primo individuo isolato di quella specie. Ogni ceppo è identificato con:

- nome del genere
- nome della specie
- sigla : può essere numeri + lettere, solo numeri o solo lettere. In particolare il ceppo tipo presenta apice finale T

I ceppi possono essere chiesti alle banche dati e devono essere disponibili a tutti.

N.B. Due ceppi appartenenti alla stessa specie NON sono identici !!

- IDENTIFICAZIONE DEI MICRO -

Vi sono diverse modalità di identificazione dei micro ma si può distinguere in:

A· approccio fenotipico

Si basa su ciò che vedo, sulle caratteristiche qualitative dei micro. La modalità più diffusa è il modello API (Analytical Profile Index) ed esso ricerca nei micro qst caratteristiche:

> morfologia cellulare
> morfologia della colonia
> risposta alla colorazione
] caratteristiche morfologiche

> fonti di energia utilizzate
> uso di fonti di C o N
] caratteristiche fisiologiche

> attività enzimatiche > habitat (pH, T, O_2)	caratteristiche ecologiche
> patogenicità (patovar) > reazioni ai fagi (fagovar) > reazioni immunologiche (serovar) > relazioni simbiotiche	caratteristiche legate alla relazione con gli altri organismi

> sensibilità agli antibiotici

> chimica della parete

> presenza di inclusioni e prodotti di riserva

Questo metodo isola il micro in coltura pura e determina preventivamente:

- reazione di Gram (se gram+ o gram−)
- morfologia (forma della cellula)
- metabolismo energetico

Si determina poi le reazioni che il micro è in grado di attuare inserendolo in una serie di pozzetti in cui sono presenti reagenti particolari. In questo test vi sono nei pozzetti a destra degli zuccheri che permettono di vedere quali usa il micro per fermentare (fermentando il pH diminuisce e nei pozzetti vi è un indicatore di variazione del pH che se il pH non cambia da il colore blu, se cambia il pH diventa giallo), mentre negli altri pozzetti vi sono altri test (enzimatici, di degradazione della gelatina ...) che mi permettono di classificare il micro.

B. approccio genetico

Usato nei laboratori e la principale analisi è la PCR. Questo metodo si basa sul contenuto genetico dei micro e segue il seguente principio: due organismi sono tanto più parenti quanto maggiore è la percentuale di DNA che hanno in comune.

Il processo prevede la separazione dei due filamenti di DNA dei due micro considerati (si denatura cioè il DNA separandolo nelle due emieliche. Questo processo è positivo in fase di duplicazione e trascrizione e risulta reversibile: infatti con T elevate il DNA si apre ma quando riabbasso T il DNA si richiude come all'inizio. Anche le proteine si denaturano, cioè perdono la struttura terziaria ma questo è un processo negativo e irreversibile !!) e la rinaturazione dei due diversi DNA: più filamenti diversi si accoppiano più i due organismi sono parenti. In particolare si è stabilito che:

- quando la percentuale di richiusura è >70% i micro sono della stessa specie
- quando la percentuale di richiusura è 25 < x < 70% i micro sono dello stesso genere
- quando la percentuale di richiusura è < 10% i micro sono di specie diverse.

Un altro approcio genetico attuato prevede lo studio di una particolare molecola di RNA ribosomale che costituisce i ribosomi e questo metodo è considerato come lo standard ufficiale di identificazione dei micro. Viene attuata la sequenza nucleotidica del rRNA che costituisce la subunità più piccola del ribosoma e la si confronta con quelle inserite nelle banche dati per vedere il grado di somiglianza. Quando la somiglianza è >97% i micro appartengono alla stessa specie, se invece è >95% sono dello stesso genere.

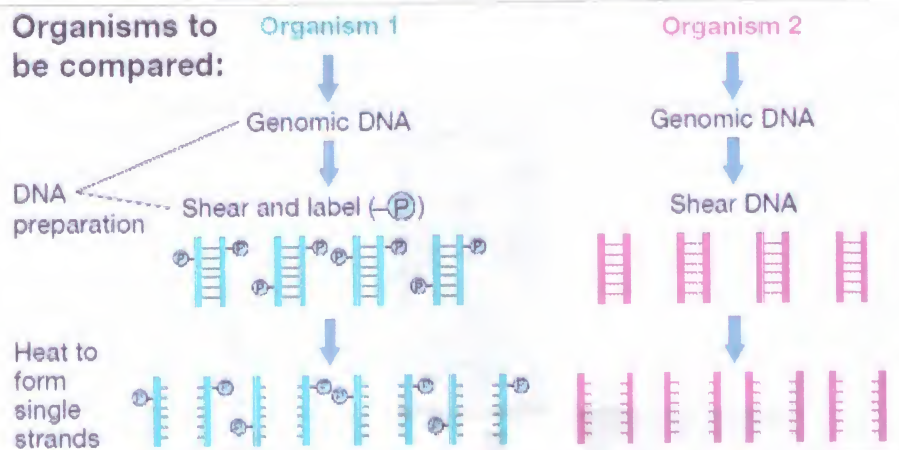
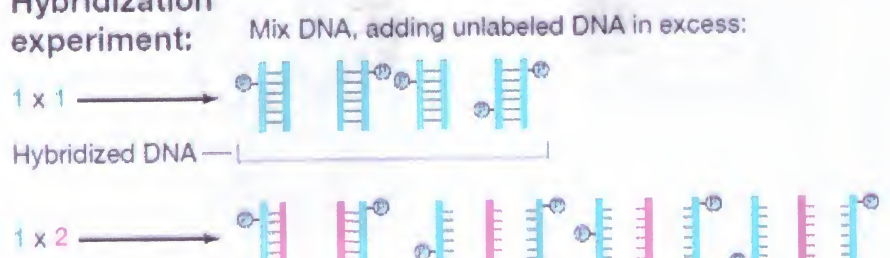
Non esiste una fonte ufficiale per la tassonomia microbica, ma le fonti sono diverse:

- iJSEM: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
- Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

} sono cartacei ma si scoprono nuove specie così rapidamente che nn sono più usati

- NCBI Taxonomy: National Center for Biotechnology Information
  Indica l'elenco dei diversi genomi dei diversi micro
- LPSN: list of Prokaryotic name with standing in Nomenclature
  Indica l'evoluzione della nomenclatura
- Ribosomal Database
  Contiene le sequenze nucleotidiche dell' RNA ribosomale

immagine: sequenza di azioni svolte nel metodo PRC

Organisms to be compared: Organism 1 / Organism 2
Genomic DNA / Genomic DNA
DNA preparation: Shear and label (–P) / Shear DNA
Heat to form single strands
Hybridization experiment: Mix DNA, adding unlabeled DNA in excess:
1 x 1
Hybridized DNA
1 x 2

– FLORA BATTERICA DEL CORPO UMANO –

Nel nostro organismo di persone sane vi sono molti micro, n^{H} batteri. Infatti il numero delle nostre cellule è dell'ordine di 10^{12} mentre il numero di batteri è dell'ordine di 10^{14}.

Vi sono quindi più batteri che cellule !! Questi sono però basilari per la nostra vita !!

Una persona sana NON presenta microbi su:

- organi interni (fatta eccezione per i reni, a contatto con l'esterno)
- sangue (contiene strutture deputate al trasporto di O_2)
- sistema linfatico (ha una funzione difensiva)

Se vi sono micro in queste zone si ha una situazione patologica (es: setticemia = micro nel sangue)

Si parla in generale di microbioma

↓

D: intera componente microbica presente nel nostro organismo.

Questi micro sono presenti in varie parti e queste parti sono caratterizzate dal contatto con l'esterno. Le superfici esposte all'ambiente sono:

(1) PELLE

Rivestimento attraverso il quale noi entriamo in contatto con l'esterno e con l'alimento.

Risulta sempre in contatto con i micro ma la carica microbica varia in base a:

> clima: in estate la carica microbica è maggiore poiché T più alta e perché si ha una maggior sudorazione che favorisce lo sviluppo. Vi sono parti dove è più favorito lo sviluppo dei micro, come le ascelle dove T più alta e dove vi sono le ghiandole sudoripare. (Il sudore ha odore perché i micro lo utilizzano per produrre altre sostanze, alcune di queste volatili).

> età: con l'aumentare viene meno l'idratazione e l'elasticità (cheratinizza = più ruvida).

> igiene: più uno è pulito meno micro vi sono ma l'eccesso di igiene è dannoso

I batteri che possono essere presenti sono:

- staphylococcus (gram +): n^{H} aureus, patogeno presente nel cuoio capelluto e nella rinofaringe che può arrivare sull'alimento a seguito di una nostra contaminazione.
- propionibacterium acne: batterio meno diffuso responsabile dell'acne
- (gram –) escherichia coli: batterio di derivazione intestinale che può arrivare sulla pelle dalle feci

Possono esserci anche funghi che creano micosi (es: candida)

② CAVO ORALE

la bocca è a diretto contatto con l'esterno e i microbi crescono bene in quanto:

- T elevata
- ci sono sempre sostanze nutritive a disposizione

Vi sono però delle sostanze che inibiscono lo sviluppo dei micro e oltre a ciò ogni volta che si deglutisce i micro finiscono nello stomaco dove vi è un pH acido che li uccide.

I microbi come risposta all'instabilità dell'ambiente orale sono n^{H} anaerobi e ciò gli permette di sopravvivere all'interno delle cavità dentali in cui si sono insediati. Quando i micro arrivano ai denti vanno a (oppure micro c'è li ha già in capsula) produrre esopolisaccaridi di consistenza mucosa che col tempo induriscono ancorando i micro ai denti. Si va a costituire il biofilm → concrezione rigida costituita da microcanali entro i quali risiedono i micro e dentro cui passa la saliva, ricca di sostanze nutritive per i micro.

Poiché però la saliva permane in questi canali non vi è ossigeno a disposizione e questo spiega come mai i micro nella nostra bocca sono n^{H} anaerobi.

Questo biofilm è definito placca batterica ed è un problema non solo sui denti ma anche all'interno delle tubature che trasportano liquidi alimentari.

I batteri anaerobi presenti sono n^{H}:

- Staphylococcus
- Streptococcus
- Lactobacillus

Questi batteri sono lattici = attuano la fermentazione lattica = da glucosio producono acido lattico.

→ quando viene prodotto abbassa il pH ed, essendo lo smalto dei denti sensibile a queste variazioni, si sfalda per portare alla formazione di CARIE, apertura attraverso cui i micro possono introdursi direttamente nel circolo sanguigno in quanto i denti sono molto vascolarizzati. Se per esempio nel sangue entra uno Streptococcus questo si va a sistemare n^{H} nelle valvole cardiache e ciò comporta dei problemi.

3 APPARATO GASTROINTESTINALE

Condotto di 5-8m che parte dalla bocca e finisce con l'apertura anale. Si distinguono 7 parti:

- BOCCA
- ESOFAGO
- STOMACO: ambiente estremamente inospitale per i micro poiché vi è un pH molto acido (~2) che limita la microflora (qualche decina o centinaio di cellule per unità di superficie, per cm^2). I micro abituati a vivere in un ambiente acido sono i batteri lattici, che producono essi stessi acido, e tra questi nello stomaco:
  - lactobacillus
  - Streptococcus

  Micro riscontrabile nello stomaco è l'Helicobacter pylori che riesce a neutralizzare l'acidità nella zona in cui si insedia rilasciando sostanze basiche come ammoniaca. Una volta ancoratisi alla parete dello stomaco, questo micro crea delle colonie che aggrediscono la mucosa creando lacerazioni (ulcere) che a lungo andare possono comportare cancri.
  Il pH dello stomaco può alzarsi in caso di patologie e questo va a favorire lo sviluppo dei micro. Un altro ostacolo allo sviluppo dei micro nello stomaco sono i succhi biliari
  → molecole tensioattive = molecole anfipatiche che presentano una parte idrofobica e una idrofilica e che vanno a sciogliere i grassi (come saponi). Questa azione è importante in quanto la parete dei gram- ha uno strato esterno lipidico che viene quindi sciolta dai succhi.
- INTESTINO: unito allo stomaco attraverso la valvola piloro. Lungo l'intestino variano:
  - pH: all'inizio è basso poi si alza per la diluizione e per la produzione di sostanze basiche (per esempio dalla degradazione delle proteine). Alla fine il pH risulta neutro o leggermente superiore.
  - O_2: buona quantità all'inizio (presente nell'alimento e inglobato deglutendo) poi diminuito poiché consumato dai micro che lo usano come accettore finale di elettroni. Il colon ne è completamente privo, è un ambiente strettamente anaerobio.

L'intestino si suddivide in due parti:

> intestino tenue: costituito da duodeno, digiuno e ileo. Presenta micro anaerobi facoltativi e micro anerobi (come lactobacillus e Enterococcus).

> intestino crasso: costituito da colon e cieco. Presenta n^ micro anaerobi stretti (come Clostridium e Bacteroides, quest'ultimo è un genere tipico dell'intestino umano e molto abbondante) in quanto è un ambiente privo di O_2, ma vi sono anche micro anaerobi facoltativi (come Escherichia coli).
Ci sono anche alcuni batteri lattici (Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium e lactobacillus) che dipendono però dalla dieta.

I micro presenti nel nostro intestino sono indicati come MICROFLORA INTESTINALE

D: insieme dei micro (n^ batteri) che abitano nell'intestino

Le caratteristiche della microflora sono:

- tipica di ogni individuo: quando un bambino è nell'utero ha l'intestino sterile in quanto si nutre per via parenterale (=attraverso il sangue). Appena nasce iniziano le prime contaminazioni e in base all'ambiente in cui vive il bambino si determina la microflora;
- la composizione della microflora dipende dalla dieta
- 1/3 delle feci, tolta l'acqua, sono batteri e (microflora) pesa circa 1-1,5 kg
- i micro nell'intestino sono continuamente cambiati. Il nostro intestino è infatti un chemiostato = vengono apportati nutrienti e vengono portati via i rifiuti e ciò permette una "crescita in continuo" = micro sempre rigenerati.
Si osserva che il transito del cibo e la duplicazione dei micro avviene simultaneamente (~24h) e questo è molto importante: se la duplicazione fosse più veloce avremo un numero eccessivo di micro, se invece il transito di cibo fosse più veloce i micro scomparirebbero.

- coltura in batch: non si interviene dall'esterno, non aggiungo né tolgo niente
- coltura in fed-batch: posso aggiungere ma non togliere alla coltura
- crescita in continuo: sia aggiungo che tolgo

- Staphylococcus
- Proteus
- Candida

- : batteri della microflora sono i primi ad essere colpiti dall'azione dell'antibiotico e ciò crea una depressione della microflora buona ed un aumento dei "micro opportunisti", micro che resistono all'azione dell'antibiotico e n° negativi. Di conseguenza la terapia antibiotica crea una disfunzione della microflora e per questo è spesso associata a problemi digestivi.

Le funzioni della microflora sono invece:

> sintesi di vitamine: assunte con la dieta o prodotte dai micro. Durante la terapia antibiotica, che sconvolge la microflora, è consigliato assumere vitamine poiché queste non sono più prodotte ma in una situazione normale non occorre assumerle perché sono prodotte a sufficienza dai micro.

> produzione di gas: più abbondanti se la flora è alterata. Sono CO_2, CH_4, H_2, N_2

> produzione di odori: sostanze volatili prodotte dall'attività degradativa dei micro, come indolo, scatolo, ammine, ammoniaca, acido solfidrico e idrogeno solforato

> produzione di acidi organici

> reazioni glicosidiche : = separano le due molecole che costituiscono i glicosidi (= dimeri o più costituiti da zucchero unito a qualcos'altro) rendendo così disponibili sostanze che di per se non lo sono. (es: β-galattosidasi separa glucosio da galattosio in lattosio).

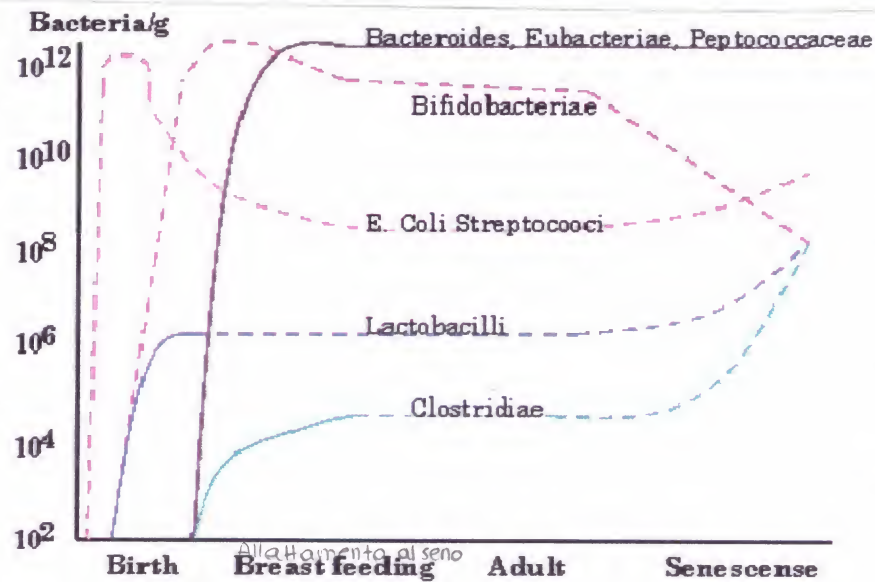
> partecipa alla digestione e all'assortimento

> stimolazione del sistema immunitario: qualsiasi corpo estraneo che ingeriamo stimola il sistema immunitario !!

> controlla il n° di micro potenzialmente pericolosi: microflora compete con i micro che arrivano e questi, non essendo adattati all'ambiente, soccombono

La flora microbica può essere alterata da diversi fattori:

- dieta: se cambia drasticamente i micro non sono abituati a quelle sostanze
- stress: stato di affaticamento generale. Ciò influisce anche sulla flora poiché essa è abituata ad una certa regolarità, sia nei pasti che nel dormire
- invecchiamento: comporta una perdita di funzionalità
- antibiotici

Composizione della microflora nel tempo

Nell'utero l'intestino è sterile ma subito dopo il parto si sviluppa la microflora e in particolare si hanno E. coli e batteri lattici, di derivazione intestinale. Con l'allattamento questi micro sono sostituiti da bifidobacteri (batteri con forma Y, più abbondanti nei baby allattati al seno) e lactobacilli (più abbondanti nei baby allattati con latte in polvere). Con la crescita si forma la microflora stabile, con la comparsa di clostridi e bacteroides, e con la senescenza diminuiscono i batteri lattici a favore dei clostridi.

- APERTURA ANALE

Le difese naturali che il nostro organismo utilizza contro i micro estranei sono:

- lisozima nelle lacrime
- la pelle secerne acidi grassi a catena corta che hanno azione battericida
- cambio repentino del pH dallo stomaco all'intestino
- continuo passaggio di urine per il tratto urinario che elimina fisicamente i micro
- muco e microciglia nell'apparato respiratorio
- pH acido nello stomaco
- la normale flora dell'intestino compete con i patogeni

- FLORA BATTERICA "NON NORMALE" DEL CORPO UMANO -

D: parassita: individuo che vive a spese di un altro organismo (es: virus)

D: patogeno: agente etiologico in grado di recare danno all'ospite

Quando il patogeno entra in contatto con l'ospite inizia una vera e propria guerra, in cui saranno messe in campo tutte le armi possibili. L'ospite può passare da uno stato di resistenza (= il patogeno non fa niente) ad uno stato di suscettibilità (il patogeno può fare ciò che vuole) e ciò dipende dalla virulenza del patogeno (= capacità con cui il patogeno scatena la malattia).

D: dose infettante: quantità minima di patogeno per determinare la patologia = n° minimo di patogeni, che devo ingerire. Espressa come N° CELLULE !!

→ si considerano i micro che creano la patologia, non le tossine !!

Si distingue in dose infettante:

- BASSA: fino a qualche centinaio di cellule ($10^2 - 10^3$). Basta quindi ingerire pochi micro poiché questi resistono alle barriere naturali dell'organismo e si vanno a moltiplicare nell'ospite (es: virus, Campylobacter).
- ALTA: serve un numero di cellule maggiore per creare la patologia in quanto questi micro resistono meno alle barriere naturali dell'organismo e quindi devono entrare in tanti. Si moltiplicano quindi nell'alimento (es: Salmonella). Si parla di milioni o più di cellule

Le due modalità con cui i micro possono attaccare il nostro organismo sono:

- TOSSIGENICITÀ

Capacità di produrre tossine = sostanze che provocano patologie (es: clostridium botulinum)

- INVASIVITÀ

Capacità di colonizzare il nostro organismo, di penetrare le barriere del nostro organismo, n° quelle gastrointestinali (es: Streptococcus pneumoniae = genera la polmonite batterica).

I micro possono anche presentare modalità intermedia a queste due.

Possiamo distinguere tre diverse patologie derivanti dalla presenza di micro nel nostro organismo:

> INFEZIONE: micro entra nel nostro organismo = supera le barriere di difesa entrando nel circolo sanguigno. Tipica della Lysteria monocitogenes ma non è sempre sintomo di malattia (es: Rhizobium nelle radici delle piante).

> **INTOSSICAZIONE**: assunzione di molecole tossiche. Nel caso dei micro presenti negli alimenti si parla di tossine = sostanze prodotte dai micro per danneggiare l'ospite. È tipica del Staphylococcus aureus e del Clostridium botulinum e in questo caso non sono dannosi i micro, ma le sostanze che essi producono in determinate condizioni all'interno dell'alimento (non dentro noi!!)

> **TOSSINFEZIONE**: è una via di mezzo. Il micro deve essere ingerito e questo si insedia nell'intestino dove può creare micro lacerazioni, aggredendo i primi strati di epitelio (non arriva però ai vasi sanguigni), e dove può iniziare a produrre tossine. È tipica della Salmonella e del Clostridium perfringens.

D: **tempo di incubazione**: tempo che trascorre da quando ingerisco il problema (o micro o tossina) a quando si manifestano i primi sintomi. È tipico di ogni organismo e può andare da poche ore a settimane o mesi. Nel caso di infezione i tempi di incubazione sono lunghi mentre nel caso di intossicazioni i tempi sono brevi. Questo in quanto con l'intossicazione viene direttamente ingerito il veleno mentre nella tossinfezione e ancora più nell'infezione ingerisco il micro e questo deve prima stabilirsi nel nostro organismo, deve adattarsi, deve attuare dei contatti, entrare nelle cellule e sopraffare le nostre difese naturali, e ovviamente tutto ciò comporta tempi più lunghi.

N.B. la presenza del patogeno è condizione necessaria ma **NON** sufficiente a provocare la malattia = deve esserci necessariamente il micro nel prodotto per contrarre la malattia ma non è detto che se è presente mi ammalo per forza (se c'è 1 salmonella non mi ammalo, ne servono di più per scatenare la patologia).

PERICOLO → la presenza di un agente dannoso

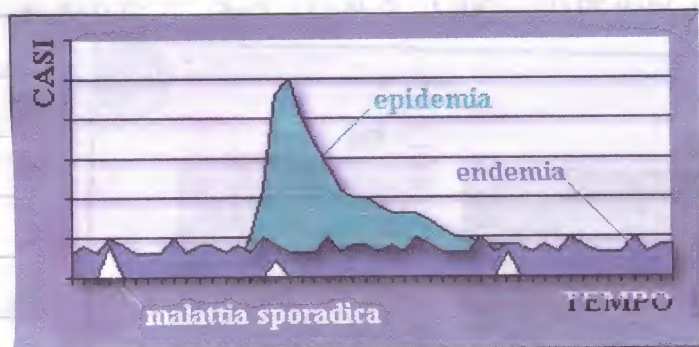
RISCHIO → probabilità che quel pericolo si concretizzi. Varia in base a:

- contaminazione: quanti micro arrivano sull'alimento
- moltiplicazione: se il micro si moltiplica nell'alimento

→ **NON ESISTE** il rischio 0!! si deve sempre accettare un certo limite di tolleranza e questo avviene anche con i micro. Per determinare i limiti tollerati di micro negli alimenti si considerano due parametri:
- severità della malattia
- quanto diffusa è la malattia

Es: per legge Salmonella assente in 25gr di prodotto = in 25gr è in quantità inferiore al livello di rischio stabilito.

le tre tipologie di malattie con cui si diffondono i patogeni sono:

- malattia **epidemica**: si manifesta in maniera repentina e con un n° di casi superiore a quello atteso per quella malattia in quella zona e in quel periodo.
- malattia **endemica**: costantemente presente in una popolazione a livelli medio-bassi. Ciò consente al micro che comporta questa patologia di continuare a riprodursi e a provocare la patologia.
- malattia **sporadica**: si manifesta in pochi casi e in modo improvviso

Vi sono diverse modalità per determinare l'incidenza di malattie dovute all'azione di micro, e sono:

1. morbilità = $\frac{\text{n° ammalati}}{\text{n° popolazione}}$
   Misura la diffusione della patologia
2. mortalità = $\frac{\text{n° morti}}{\text{n° popolazione}}$
   Misura anch'essa la diffusione della patologia ma è minore della precedente poiché le persone prima di morire si ammalano
3. letalità = $\frac{\text{n° morti}}{\text{n° ammalati}}$
   Misura la gravità di una patologia

Questi parametri permettono di descrivere numericamente l'andamento delle malattie.

le principali cause di patologie alimentari sono:

> batteri: quali
- Salmonella: ~ 50% dei casi di ospedalizzazione nel 2009-2010 negli USA
- Clostridium perfringens
- Escherichia coli: vi sono 5-6 categorie diverse che producono tossina dannosa n^{4} per i reni.
- Campylobacter
- Bacillus cereus
- Staphylococcus aureus
- Shigella (si legge shighella)
- Clostridium botulinum
- Listeria monocytogenes
- Vibrio parahaemolyticus
- Yersinia

> tossine e sostanze chimiche: quali: - ammine biogene : compoita sindrome sgombroide
- ciguatossina: compoita patologia legata al consumo di pesce
- micotossine

> parassiti

> virus: diffusi n# per l'incidenza ma non per ospedalizzazione. Noi studiamo:
- norovirus: principale causa di problemi alimentari
- epatite A: epatite alimentare
- rotavirus

Si osserva che per casi gravi o molto gravi 1/3 dei casi presenta causa ignota mentre il restante 2/3 ha causa definita. Nel caso invece di casi medi o lievi circa l'80% dei casi presenta causa ignota!!

In ambito domestico i principali agenti eziologici sono:

1- norovirus 58%
2- Salmonella non typhoidae 11%
3- Clostridium perfringens 10%
4- Campylobacter 9%
5- Staphylococcus aureus 3%

Sempre in ambito domestico, i patogeni che provocano una malattia che richiede il ricovero sono:

1- Salmonella non typhoidae 35% xchè colpisce molte persone e molte in categorie a rischio
2- norovirus 26% molto diffusi ma portano a disturbi lievi
3- Campylobacter 15%
4- Toxoplasma 8% agente della toxoplasmosi, è 1 protozoo
5- E. coli (O157) produttori 4%

sempre in ambito domestico, i patogeni che provocano morte sono:

1- Salmonella non typhoidae 28%
2- Toxoplasma 24%
3- Lysteria monocitogenes 19% poco diffusa ma molto letale
4- norovirus 11%
5- Campylobacter 6%

ESEMPIO: secondo i dati del 2011 sulla popolazione americana (300 000 000):

	n° ammalati	n° ricoveri	n° morti
a • Listeria monocytogenes	1600	1500	250
b • Salmonella non tyfoidae	1000 000	19000	380

MORBILITÀ

a = $\frac{n° \text{ammalati}}{n° \text{popolazione}} = \frac{1600}{300000000}$ = 0,53 ‰oo = 0,53 su 100 000 bassa

b = $\frac{n° \text{ammalati}}{n° \text{popolazione}} = \frac{1000000}{300000000}$ = 0,00 33 = 3 ‰ = 300 su 100 000 più elevata

MORTALITÀ

a = $\frac{n° \text{morti}}{n° \text{popolazione}} = \frac{250}{300000000}$ = 0,083 ‰oo — 0,08 su 100 000

b = $\frac{n° \text{morti}}{n° \text{popolazione}} = \frac{380}{300000000}$ = 0,126 ‰oo — 0,126 su 100 000

entrambe molto basse

LETALITÀ

a = $\frac{n° \text{morti}}{n° \text{ammalati}} = \frac{250}{1600}$ = 15,6 % letalità maggiore !!

b = $\frac{n° \text{morti}}{n° \text{ammalati}} = \frac{380}{1000000}$ = 0,038 % letalità minore

Per entrambi i micro il limite nell'alimento è l'assenza in 25 gr di prodotto. Anche se la L. presenta una letalità (=n° morti) maggiore viene cmq applicato lo stesso limite anche alla S. (che ha letalità molto minore) poiché, oltre alla severità della malattia che questi patogeni possono comportare, si deve considerare anche la diffusione della malattia, molto più elevata con S. L'elevata diffusione comporta infatti un costo sociale (es: se il prof non viene a lezione noi abbiamo speso per niente bus, treno, benzina...) e per questo viene considerata in egual maniera importante.

↓↓↓↓

Tutte le categorie di alimenti possono dare problemi legati a contaminazioni microbiche !!.

Gli ambienti dove maggiormente si contraggono malattie dovute a contaminazione microbica sn:

- ristorazione collettiva per gruppi a rischio (asili, ospedali, ospizi): episodi 39
- ristorazione collettiva per altri gruppi (mensa uni, mense fabbrica): episodi 46 (più bassi perché si hanno più controlli)
- ristorazione pubblica (ristoranti, bar): episodi 378
- rosticceria: episodi 49
- casa privata: episodi 1238 → 70% dei casi !! Nei casi precedenti, infatti, vi sono controlli e vi sono leggi da rispettare perché altrimenti si incorre in una sanzione penale. In casa invece non c'è tutto questo e vi è anche molta ignoranza.

I fattori di rischio che portano ad una contaminazione dell'alimento sono:

(a) scorretto mantenimento T

Molto frequente in ambito domestico poiché spesso si interrompe la catena del freddo o si attua un abuso termico (conservo il prodotto a una T superiore a quella di conservazione).

(b) cottura inadeguata

Quando si cuoce meno del necessario. Posso comunque mangiare un prodotto non cotto completamente, basta però aver eliminato tutti i micro presenti.

Es: fiorentina: se arriva da un animale sano, ci possono essere micro solamente sulla superficie dove ho toccato quindi basta scottarla ed è sicura.

polpetta: i micro sono su tutto il volume, anche dentro perché ho toccato tutto il macinato per farla e quindi devo cucinarla completamente, altrimenti aumenta il rischio

(c) cibo ottenuto da fonti incerte

vale n° nelle case private perché nella ristorazione collettiva la filiera deve essere controllata. Per evitare allora problemi è consigliato attuare una cottura prolungata.

(d) cibo crudo

lo posso comunque consumare ma se non tratto con il calore il rischio di patologie aumenta

(e) contaminazione dell'attrezzatura

(f) cattiva igiene dell'alimentarista

(g) contaminazione crociata

Contaminazione dei cibi cotti con i cibi crudi. È la modalità più frequente con cui si ha una contaminazione da campilobacter (bastano infatti solo 500 cellule per dare campilobacteriosi).

(h) più giorni tra la preparazione e il consumo

Con il passare del tempo aumenta la possibilità che i micro si sviluppino nell'alimento ma per rallentare ciò posso applicare T inferiori. La T a cui si blocca lo sviluppo del patogeno varia da micro a micro e vi sono anche micro psicrofili = non rallentano il loro sviluppo anche se la T diminuisce (es: Listeria monocytogenes).

(i) scorretta preparazione

(l) alimentarista colonizzato

Vi sono micro che permangono anche se i sintomi scompaiono e quindi questa persona diventa un untore = può portare i micro nell'alimento.

- MICRO VS ORGANISMO UMANO -

I ARMI DEI MICRO

Le armi che i microbi possono utilizzare nell'attaccare il nostro organismo sono:

(A) esotossine
(B) endotossine
} più importanti sostanze dannose prodotte dai BATTERI

(C) ammine biogene: o bioammine. Molecole prodotte da batteri non patogeni, sono molecole organiche che derivano dal metabolismo degli ammino e che hanno effetti sul metabolismo umano. Nella maggior parte dei casi non sono gravi.

(D) micotossine: molecole tossiche prodotte dai funghi, n^st da muffe, molto diffuse negli alimenti e molto pericolose (= tossicità cronica che nel caso più grave può portare a cancro).

(E) batteriocine: sostanze prodotte da batteri che sono tossiche per gli altri batteri ma non per l'uomo.

D: TOSSINA: sostanza che altera lo stato di salute del consumatore.

É importante ricordare la definizione data da Paracelso (verifica su slide): "Tutte le cose possono essere veleno o tutte le cose possono NON essere veleno, ciò che fa da discriminante è la DOSE". Es: Clostridium botulinum fa tossina botulinica dannosa (se in dose elevata) ma in dosi molto minori è utilizzata in chirurgia estetica in quanto non consente la contrazione muscolare e quindi appiana le rughe.

Le diverse attività che una tossina può esercitare sulle nostre cellule sono:

- danneggiare la membrana: le tossine vi si inseriscono posizionandosi a "doghe di botte" = 1 vicina all'altra lasciando un buco centrale attraverso il quale può entrare di tutto nella cellula e questo fa venir meno l'equilibrio interno e la forza proton-motrice.
- inibizione della sintesi proteica
- attivare metabolismi secondari: questi alterano il metabolismo normale, scombinando gli equilibri della cellula (es: colera)
- effetti sulla trasmissione dell'impulso nervoso: tipico del C. botulinum e del C. tetani
- attiva una risposta immunitaria: avviene SEMPRE

(A) Le esotossine sono molecole che il batterio produce per attuare un'azione specifica, mirata. Sono delle proteine quasi tutte con funzione enzimatica (enzima = molecola che catalizza sempre la stessa reazione) e proprio perché sono specifiche ed efficienti sono molto tossiche. Sono idrosolubili e possono essere suddivise in diverse categorie:

- neurotossiche: effetti sul trasporto dell'impulso nervoso
- enterotossiche: effetti sull'intestino
- citotossiche: danneggiano le cellule. Importanti sono quelle emolitiche (uccide i globuli rossi)

Geni che codificano per queste proteine si trovano spesso su DNA extracromosomale (come plasmidi o fagi) e quindi con un trasferimento orizzontale possono arrivare a qualsiasi micro e inglobarsi nel suo DNA. Questo processo ha fatto sì che alcuni ceppi, prima non patogeni, lo diventassero dopo aver inglobato questi geni tossici.
A volte sono costituite da più subunità, da più polipeptidi uniti, e nel caso del Vibrio cholerae una subunità è tossica mentre l'altra ha funzione legante o di riconoscimento (= serve a collegare la proteina con la cellula). Micro che producono esotossine sono: C. botulinum, C. perfringens, C. tetani, E. coli, Shigella dysenteriae (fa Shigatoxin, una delle tossine più forti), S. aureus, Streptococcus pyogenes, Vibrio cholerae, Yersinia pestis (agente della peste).

(B) Le endotossine sono una componente cellulare della parete dei batteri GRAM- e di conseguenza possono essere prodotte solamente da questa tipologia di micro. Micro che le presentano sono Salmonella, Shigella, Yersinia, E. coli (tt della famiglia delle enterobatteriacee). Non sono rilasciate all'esterno come le esotossine ma si liberano quando la cellula si disgrega o nel caso di turn-over delle cellule.

PROPRIETA'	ENDOTOSSINE	ESOTOSSINE
Natura chimica	Lipopolisaccaride(grasso+zucchero) Sono – grandi: 10kDa	Proteine Sono + grandi e complesse: 50-1000 kDa
Produttori	Gram -	Sia Gram- che Gram +
Rapporti con la cellula	Parte della membrana esterna Non sono rilasciate	Sono extracellulari Vengono rilasciate
Trattamento termico	Termostabili in quanto non hanno una determinata struttura da mantenere	Generalmente termolabili perché essendo proteine devono mantenere la loro struttura ma si denaturano con il calore(= perdono la loro struttura 3aria). Vi sono però delle eccezioni(es: tossina Stafilococcus aureus)
Potere immunogenico = capacità di scatenare una reazione del sistema immunitario	scarso	elevato
Tossicità Misurata con DL50=dose letale nel 50% dei casi	200-300 µg/topo $2*10^{-8}$ g/topo (+ bassa)	25 pg/topo $25*10^{-12}$ g/topo (+ alta)
Specificità	Bassa, un solo tipo di sintomi	Alta, più tipi di sintomi
Sintomi	Aspecifici (febbre, nausea, stanchezza...)	Specifici e diversi da esot a esot
Pirogenicità = capacità di alzare la T= febbre	Si, detti pirogeni esogeni	Non frequente (se c'è è dovuta alla risposta immunitaria del

II INTERAZIONI PATOGENO – OSPITE

Il contatto tra i micro e il nostro organismo avviene a livello della mucosa intestinale, singolo o multistrato di cellule epiteliali che riveste il nostro apparato intestinale e che funge da barriera tra l'interno e l'esterno (lume intestinale). Le cellule sono molto strette tra loro, hanno una struttura a palizzata, e sono coperte da uno strato di muco (= polisaccaridi) che ha diverse funzioni come permettere l'ancoraggio dei micro. Se distendiamo tutte le nostre mucose arriviamo ad una superficie di 400 mq!! Le mucose sono infatti spesso ripiegate e questo n^H nell'intestino, dove formano villi e microvilli che permettono di aumentare la superficie di scambio (n^H di assorbimento).

Le diverse fasi con cui procede la relazione micro-organismo sono:

⓪ Esposizione ai patogeni

① Adesione

Il micro entra in contatto con il nostro organismo. L'adesione può essere:

- blanda: per contatto fisico, del tutto aspecifica, inefficace e temporanea
- stretta: specifica, avviene quando micro e organismo si riconoscono. E' ospite-specifica (Es: Salmonella riconosce uomo ma nn il pollo) (= micro riconosce il loro ospite) e tessuto-specifica (= micro riconosce tessuto su cui agire) (Es: Salmonella riconosce tessuto intestino ma nn agisce se si trova sulla pelle). I micro prediligono certi tessuti in quanto sono in grado di riconoscere i loro recettori specifici (come fa Salmonella) oppure in quanto riconoscono determinate sostanze abbondanti nell'ambiente (come Brucella abortis che si sviluppa in ambienti dov'è abbondante lo zucchero eritrolo e questo avviene nella placenta).

L'adesione è mediata da:

> glicocalice o capsula, costituita da zucchero e proteine

> lipopolisaccaridi nei gram –

> fimbrie e pili: estroflessioni che si diramano dalla capsula

Queste strutture entrano in contatto con recettori specifici dell'ospite e a seguito di ciò inizia l'interazione.

② invasione dell'epitelio intestinale.

Il micro entra nella cellula ospite oppure può stabilirsi sulla sua superficie e inizia a riprodursi e a produrre le tossine.

③ crescita e colonizzazione

Il micro riproducendosi raggiunge una massa critica di cellule, di tossine o di entrambe e questo altera lo stato di salute dell'ospite. In particolare si può riscontrare:

- TOSSICITÀ: il micro altera lo stato di salute producendo tossine;
- INVASIVITÀ: il micro può penetrare i vari strati di cellule fino ad entrare nel circolo sanguigno. Ciò gli permette di spostarsi all'interno dell'ospite e quando trova un altro ambiente favorevole dove riprodursi vi si stabilisce dando origine ad un nuovo focolaio.

④ danneggiamento

L'azione del micro può provocare alla cellula danni lievi oppure la morte e questa risulta molto frequente n[a] per le cellule della mucosa intestinale (questo spiega come mai certe volte si ha sangue nelle feci, perché quando il micro attacca la mucosa intestinale può creare delle lacerazioni).

La risposta di ogni individuo ad un attacco microbico dipende dalle condizioni di efficienza e di salute del sistema immunitario. Quelli individui che combattono più difficilmente i patogeni rientrano nelle "categorie a rischio" in quanto il loro sistema immunitario non è completamente efficiente, e questo può dipendere da diversi fattori, quali:

- ETÀ: quando un bambino nasce è sterile, non è mai entrato in contatto con micro e quindi il suo sistema immunitario deve allenarsi per svilupparsi. Per un anziano invece, il sistema immunitario perde efficienza e quindi aumenta il rischio di attacchi microbici. Sia i bambini che gli anziani sono quindi delle categorie a rischio ma il numero maggiore di problemi è dovuto agli anziani perché questi hanno la mentalità di non buttar via niente e quindi possono consumare anche cibi non sicuri. Per i bambini, che sono alimentati dai genitori, non c'è questo problema.
- DISTURBI METABOLICI: malfunzionamenti dell'organismo che aumentano anche il rischio di attacchi microbici (es: diabete, allergie, ipertensione).
- DIETA: nel caso di malnutrizione, di carenze proteiche o vitaminiche.

• STATO DI SALUTE: se il sistema immunitario è impegnato su altri fronti sicuramente sarà meno efficiente contro un attacco microbico. Eventuali terapie che possono limitare l'efficienza del sistema immunitario sono:
- terapie farmacologiche
- terapie immunodepressive: abbassano l'efficienza del sistema immunitario volontariamente. Sono applicate su persone che, per esempio, devono subire un trapianto così da evitare un rigetto
- AIDS: sindrome immuno depressiva
- infezioni
- gravidanza: una donna incinta non ha problemi legati ad una minore efficienza del sistema immunitario ma, poiché il feto è geneticamente diverso dalla madre, per evitare un eventuale rigetto viene ridotta l'efficienza del sistema immunitario nella placenta. Poiché, nella maggior parte dei casi i micro non arrivano fino alla placenta, la donna non ha problemi ma è comunque considerata come una categoria a rischio. Patogeno che può arrivare alla placenta è la Listeria monocytogenes.

• STRESS: una alterazione dei ritmi di vita o bruschi cambiamenti climatici possono alterare la regolarità dell'organismo e quindi anche del suo sistema immunitario.

• OSPEDALIZZAZIONE: persone all'ospedale sono categorie a rischio.

• FUMO, ALCOOL, DROGHE ...

Questi fattori fanno rientrare le persone nelle categorie a rischio ma spesso sono presenti più fattori in un singolo individuo e quindi più caratteristiche sono presenti in un individuo maggiore sarà il rischio di contrarre patologie.
Proprio perché le categorie a rischio presentano un rischio maggiore di essere colpiti da patologie microbiche, la dose infettante risulta minore !! Quindi anche i limiti, i parametri microbici da rispettare negli alimenti saranno minori !!

III DIFESE DELL'ORGANISMO

Le difese sono presenti n^a nel sistema sanguigno e linfatico e si distinguono in:

- difese aspecifiche: non riconoscono un singolo agente ma li combattono tutti
- difese specifiche: riconoscono l'agente da attaccare
- difese cellulari: i difensori sono delle cellule
- difese acellulari: o umorali, si trovano nella parte liquida del sangue o in altri liquidi

	ASPECIFICHE	**SPECIFICHE**
CELLULARI	Sono **leucociti** (globuli bianchi) presenti nel sangue e che si muovono al suo interno contraendo delle fibre di actina. Quando vengono a contatto con una cellula estranea la inglobano e la digeriscono e per questo sono anche definiti **fagociti**. Sono detti anche **macrofagi** per le loro grandi dimensioni (10-15 µm).	Sono i linfociti, anch'essi leucociti, che vanno a produrre gli anticorpi. Si distinguono due diverse tipologie: **1- linfociti B** Costruiscono l'anticorpo non appena entrano in contatto con l'antigene; **2- linfociti T** L'antigene deve essere portato ai linfociti affinché essi costruiscano l'anticorpo e questo viene fatto da particolari cellule dette "presenting cells". I linfociti per costruire l'anticorpo si basano sulla struttura esterna dell'antigene, si modellano su di essa e questo fa si che l'anticorpo sia assolutamente specifico. Ai linfociti non importa se l'antigene è vitale o è morto, basta che sia integro cosi da potervi modellare sopra l'antigene (corpo) e questo aspetto è molto importante in quanto viene sfruttato per la produzione di vaccini.
ACELLULARI	Enzimi, come il lisozima presente nella saliva	**Anticorpi** o gamma globuline (così chiamate per la loro forma a γ), prodotti quando nell'organismo arriva un **antigene** = qualsiasi sostanza o struttura che ha la capacità di indurre la produzione di anticorpi. Gli anticorpi riconoscono solamente l'antigene che ha provocato la loro produzione.

sito attivo è su bracci struttura

Per quanto riguarda gli anticorpi, essi possono agire in diverse maniere:

- neutralizzazione: attività principale. L'anticorpo si attacca all'antigene e questo non è più in grado di funzionare.
- precipitazione: si ha precipitazione quando qualcosa che prima era in soluzione desolubilizza. Avviene in quanto le singole parti che erano solvatate nell'H_2O si aggregano a formare macromolecole. Se in soluzione vi sono molti più antigeni che anticorpi solamente pochi antigeni si attaccheranno agli anticorpi, così da formare agglomerati che però, essendo troppo pochi, non precipitano.

lo stesso avviene se vi sono molti anticorpi rispetto agli antigeni. Nel caso in cui, invece, si ha una uguale quantità di antigeni e anticorpi si vanno a costituire lunghe catenelle dove ogni antigene è unito ad una estremità di due anticorpi diversi. Questo lungo polimero è pesante quindi precipita dando torbidità alla soluzione. Questo processo viene sfruttato a fini diagnostici per attuare la titolazione dell'antigene = quanto antigene c'è nell'alimento.

- agglutinazione: anche questa tecnica sfrutta il fatto che l'antigene ha più punti dove si può attacre l'anticorpo e questo permette la formazione di aggregati.
Si prendono delle microparticelle di lattice e vi si fissano degli anticorpi specifici per il determinato antigene che si vuole trovare e ciò porta ad una formazione di una miscela torbida. Per vedere in una soluzione se è presente quel determinato antigene aggiungo parte della miscela: se l'antigene è presente si lega agli anticorpi andando a costituire un mega aggregato visibile ad occhio nudo. Questa tecnica è utilizzata per determinare il gruppo sanguigno.

pus: tutte le cellule di macrofagi che si sono sacrificati per evitare l'entrata di corpi estranei attraverso una apertura che si è creata. I macrofagi sono i primi ad agire e si parla di micro piogeno quando induce la produzione di pus. É una difesa aspecifica.

vaccino: inietione nel nostro organismo di un patogeno così che esso vada ad indurre la produtione di anticorpi. Questi patogeni inseriti non devono però essere virulenti altrimenti causerebbero la patologia (perché anticorpi non fatti subito ma prima il patogeno deve entrare in contatto con le cellule che li producono, poi devono essere assemblati e messi in circolo = molto tempo) ma devono comunque presentare la loro struttura originale poiché è in base a questa che si costituiscono gli anticorpi. Questo viene fatto in quanto le cellule presentano una memoria, cioè una volta costruito l'anticorpo se lo ricordano, ma questa non dura per sempre e per questo si attuano i richiami, vaccini più blandi atti a risvegliare la memoria. Si procede in maniera diversa per i diversi antigeni:

- batteri: iniettati morti
- virus: iniettati inattivati
- tossine: iniettate come toxoide = tossina modificata in laboratorio a cui è stata tolta la tossicità mantenendo però invariata la struttura esterna

micro pirogeno: induce la febbre

- ORIGINE DEI MICRO NEGLI ALIMENTI -

contaminazione: atto per cui sull'alimento arriva qualcosa che non gli appartiene, che non fa parte della sua composizione (micro, sostanze tossiche...)

→ Nessun alimento non è contaminato!! Non si tratta però di un termine negativo e questo è dimostrato dal fatto che alcuni alimenti, come lo yogurt, devono essere necessariamente contaminati per essere prodotti.

La contaminazione può avvenire in diverse fasi della vita di un prodotto e in base a ciò si può distinguere in:

A contaminazioni primarie

Avvengono là dove si genera la materia prima, quindi nel campo per i prodotti vegetali, nell'allevamento per i prodotti animali. Sono le contaminazioni più diffuse e i micro in questo caso sono veicolati da:
(È l'ambiente con n° + elevato di micro ma alimento ha delle protezioni)

- H_2O
- suolo: fonte importante di micro per i prodotti vegetali. I generi più diffusi sono:
  - Bacillus
  - Clostridium
  - Enterobatteri fecali: micro ad habitat intestinale, che derivano dalla concimazione organica

  (Batteri)

  - muffe: micro più diffusi nell'ambiente e i generi più frequenti sono:
    - › Aspergillus
    - › Penicillium
    - › Fusarium
    - › Botrytis (meno diffusa
  - lieviti: meno diffusi
- H_2O marina: possono veicolare micro sugli alimenti e i generi presenti sono:
  - vibrio: micro ad habitat marino
  - coliformi fecali: micro di origine intestinale, che derivano dagli scarichi di feci in mare
- aria: la quantità di micro dipende dalle condizioni ambientali e condizione favorevole al loro sviluppo è l'umidità - microgocce d'acqua importanti per lo sviluppo dei micro (quindi + aria umida + micro trasporta).

• barriere di superficie : involucri, coperture naturali che il prodotto possiede e che hanno la funzione di difendere le parti interne dai micro esterni. Sono considerate fonte di contaminazione in quanto, pur essendo all'esterno possono entrare in contatto con l'interno (es: quando apro uovo, quando taglio mele)
I generi di micro presenti sulle barriere sono:
- sui prodotti animali: enterobatteri fecali
- sulla frutta: lieviti come Saccharomyces cerevisiae, batteri lattici e acetici
- muffe: Aspergillus, Penicillium, Botrytis
• tubo digerente degli animali: involucro interno che protegge gli organi dal passaggio del contenuto intestinale. Le operazioni di eviscerazione può portare micro sul prodotto come enterobatteri fecali, batteri lattici, Staphylococcus, Clostridium e patogeni quali Yersinia e Campylobacter.

[B] contaminazioni secondarie

Si verificano durante le fasi di lavorazione del prodotto (si ha una FORTE contaminaz.!!) e sono causate da micro presenti sul luogo di lavoro. Comportano un aumento della carica microbica in quanto l'alimento, venendo lavorato, viene a contatto con l'elevato numero di micro derivanti dall'ambiente di generazione della materia prima che prima avevano potuto contaminare solamente le parti più esterne del prodotto, in quanto questo è dotato di difese (barriere di superficie come buccia, guscio...), ma che ora possono arrivare nelle parti più interne. I micro presenti sul luogo di lavorazione derivano da:
• superfici e utensili
• personale: può apportare n^tt batteri che possono avere due diverse origini:
> intestinale: se si ha carenza di igiene
> cuoio capelluto o cavo orale: vi deriva lo Staphylococcus aureus e per questo durante la lavorazione si usano cuffie e mascherine.

C contaminazione terziaria

legata alla conservazione e al trasporto del prodotto e i micro possono essere presenti sugli involucri o sulle superfici con cui l'alimento viene in contatto durante il trasporto e la commercializzazione.
la contaminazione è indipendente da T, dipende solo dal contatto fisico tra il prodotto e i micro, ma è correlata ad essa in modo indiretto in quanto + T + i micro si sviluppano e quindi prodotto potrà entrare in contatto con un numero maggiore di micro.

D contaminazione quaternaria

Contaminazioni che avvengono quando l'alimento è in mano al consumatore finale quindi sia a livello domestico che a livello della ristorazione collettiva. I micro sono veicolati n^H dall'operatore che utilizza l'alimento ma anche dalle diverse superfici con cui l'alimento viene a contatto.
Sono le contaminazioni che comportano più problemi, anche se il n° maggiore di micro deriva da contaminazione primaria e se la maggior parte dei micro contamina l'alimento in fase secondaria. Questo in quanto nei casi precedenti vi sono delle norme, delle leggi da rispettare e ciò diminuisce la probabilità di contatto tra micro e alimento mentre nel consumo domestico non vi sono norme da seguire quindi la probabilità di contaminaz. aumenta.
Oltre a questo il consumatore non ha una adeguata educazione alimentare.

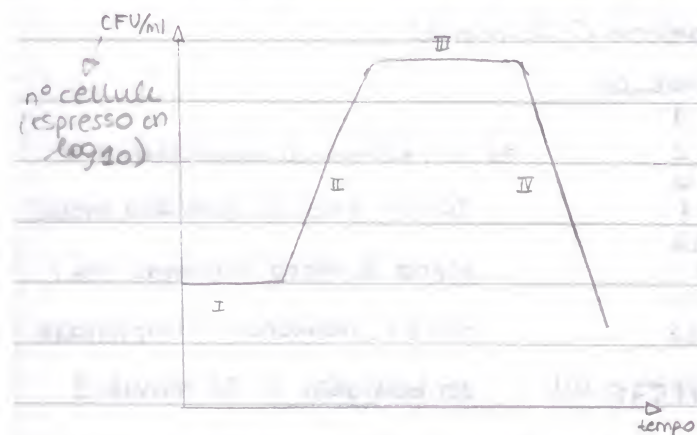
ricontaminazione: su di un alimento in cui sono stati eliminati tutti i micro, ne arrivano altri.
Questo è un problema per i cibi precotti in cui i micro sono stati uccisi con la cottura ma poi con il confezionamento vengono ricontaminati.
È più pericolosa della contaminazione perché lo sviluppo dei micro è più favorito: nella contaminazione i micro che arrivano devono lottare con quelli già presenti per sopravvivere, nella ricon. quando i micro arrivano non trovano nessun ostacolo e quindi si sviluppano maggiormente.
Un tipo di ricon. è la contaminazione crociata: l'alimento arriva sullo stesso posto dopo che tutti i micro sono stati uccisi (es: metto pollo cotto nel piatto in cui c'era il pollo crudo).

la flora microbica presente sul prodotto deriva allora dal percorso che il prodotto subisce.

In linea generale, se un prodotto è di origine industriale presenterà delle caratteristiche organolettiche minori ma sicuramente presenterà una maggior sicurezza per quanto riguarda la eventuale presenza di micro. Se un prodotto è invece di origine artigianale presenterà delle caratteristiche organolettiche più particolari e più intense ma sarà meno sicuro dal punto di vista della contaminazione microbica.

- CRESCITA MICROBICA - → vedi pg. 183 libro micro

La contaminazione avviene, solitamente, con un numero ristretto di micro e la presenza di micro è una condizione necessaria ma non sufficiente per determinare l'insorgenza di eventuali malattie. L'insorgenza di patologie avviene solamente se i micro presenti posso accrescersi e svilupparsi e questo avviene quando il micro trova condizioni ambientali favorevoli, quando ha a disposizione tutti i diversi fattori che ne favoriscono lo sviluppo.

L'andamento della crescita batterica viene rappresentato dalla curva di crescita

Questo grafico è costruito osservando la crescita dei micro in batch = in un ambiente chiuso, dove non viene né apportato né tolto niente.

La curva può essere divisa in diverse fasi:

I. fase di latenza
II. fase logaritmica
III. fase stazionaria
IV. fase di morte

Si tratta di un grafico semilogaritmico = un asse è logaritmico e uno aritmetico

Fase in cui la velocità di sviluppo della popolazione è massima per quelle condizioni ambientali. Nel grafico la velocità di crescita è rappresentata come la pendenza delle rette ed è quindi il coefficiente angolare delle rette. Perciò più le rette sono inclinate maggiore è la velocità di crescita. La fase logaritmica dipende però dalle condizioni ambientali quindi se io le rendo ostili la velocità di sviluppo diminuirà e per raggiungere una certa carica microbica ci vorranno tempi più lunghi. (è ciò che accade mettendo in frigo i cibi: diminuendo T micro si accresco con v minore).

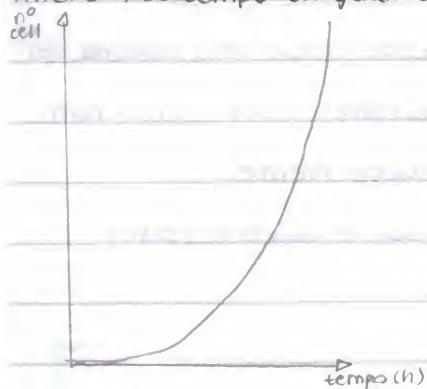
Un altro fattore, oltre che rendere ostili le condizioni di sviluppo, per allungare la shelf-life degli alimenti è garantire l'igiene durante la produzione.
Infatti se si parte da una carica microbica iniziale elevata ci vorrà un tempo minore affinché si sviluppi un elevato quantitativo di micro e quindi si deve cercare di abbassare il più possibile la carica iniziale, aspetto raggiungibile lavorando sull'igiene.

La legge che descrive la crescita microbica è:

$$N_t = N_0 \cdot 2^n$$

N_t = n° micro al tempo t
N_0 = n° micro iniziali
n = n° di generazioni

Si parla di tempo di generazione (+ una popolazione sta bene + DIMINUISCE il tempo di generazione!!) o di duplicazione per indicare il tempo necessario per passare da una generazione ad un'altra, il tempo che i microbi impiegano per duplicarsi.

Caratteristica particolare dello sviluppo microbico è il fatto che esso sia ESPONENZIALE: i micro nel tempo di generazione si accrescono di un numero pari ai micro già presenti.

n° cell / tempo (h)

se il tempo di generazione è 30 minuti

tempo (h)	n° cellule
0	1
0,5	2
1	4
1,5	8
2	16
2,5	32
3	64
3,5	128
....	
10	1048576 !!!

Es: se il tempo di generazione è 20 min e ho una bottiglia metà piena di micro, il tempo che i micro ci mettono a impienare la bottiglia è 20 minuti!!

I fattori che influenzano la crescita dei micro possono essere suddivisi in due categorie:

1- fattori intrinseci all'alimento

Sono propri di quel alimento, non cambiano durante la vita dell'alimento. I principali sono:

A. pH
B. AW
C. potenziale redox
D. nutrienti, inibenti (sostanze che bloccano lo sviluppo micro) (aggiunti ma n^{tt} naturalmente presenti), additivi (sost. che può o- favorire sviluppo) (sn sempre aggiunti)

2- fattori estrinseci all'alimento

Non sono costanti, variano a seconda della situazione esterna in cui l'alimento si trova. Sono

E. T
F. atmosfera in cui si trova l'alimento
G. umidità dell'aria

Questi parametri possono variare all'interno delle stesso alimento quindi vi sono molti micro= ambienti diversi e i micro si possono sviluppare in zone diverse del prodotto.
Per garantire la sicurezza, la salubrità dell'alimento si deve operare sui fattori intrinseci perché questi rimangono costanti nel tempo quindi una volta che li ho regolati rimangono tali, cosa che invece non avviene per i fattori estrinseci che variano nel tempo e quindi rendono meno sicuro il prodotto.

A PH

D: parametro che indica la concentrazione di protoni H^+ nell'ambiente

Il pH può essere misurato solo dov'è presente H_2O liquida in quanto i protoni derivano dalla dissociazione dell'H_2O stessa:

$$H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^- \qquad pH = -\log[H^+]$$

Spesso si confonde tra pH e acidità: il pH misura la frazione di acidi dissociati e può essere misurato solo se presente H_2O, l'acidità indica, invece, la quantità totale di acidi presenti e può essere misurata sempre con il processo di titolazione.

ACIDO: molecola che in H_2O libera protoni
- acido iodidrico HI, HCl • FORTE: si dissocia completamente
- etano CH_3CH_3, NH_3 • DEBOLE: si dissocia parzialmente

BASE: molecola che in H_2O acquista protoni
- • FORTE: completamente dissociata NaOH, KOH
- • DEBOLE: parzialmente dissociata

Ogni unità di pH indica una quantità di H^+ 10 volte inferiore o superiore
Es: pH=3 ha 10 volte più H^+ liberi rispetto a pH=4
I micro non possono essere vitali se non c'è H_2O quindi risentono molto del valore di pH.
I micro prediligono ambienti con pH neutro così da non dover spendere energia per riequilibrare il pH interno (~ neutro) con quello esterno. Più il pH esterno si allontana dalla neutralità più è un problema per la cellula in quanto i protoni tendono a spostarsi dalle zone a maggior concentrazione verso zone a minor concentrazione e la cellula dovrebbe spendere energia per evitare ciò. L'energia spesa per bloccare questo flusso di H^+ fa sì che l'accrescimento avvenga più lentamente in quanto vi è un quantitativo minore di energia a disposizione. Quindi tanto più ci si allontana dalla situazione ottimale di pH neutro tanto più la velocità di duplicazione dei micro diminuisce ed è proprio ciò che devo sfruttare per limitare lo sviluppo microbico all'interno del mio alimento.
I funghi, come lieviti e muffe, vivono bene in un range molto ampio di pH, $2 < pH < 9$ per i

lieviti e meno di $2 < pH < 11$ per le muffe, quindi andando a variare il pH non posso bloccare la loro crescita, al massimo posso rallentarla e ciò è verificato dal fatto che le muffe possono crescere anche sul limone, uno degli alimenti più acidi.

Diverso è il discorso per i batteri, che vivono in un range di $4,5 < pH < 9$

→ livello di pH al di sotto del quale i batteri PATOGENI non si sviluppano !!

Considerando il pH degli alimenti, posso suddividere in due grandi categorie:

1• alimenti di origine vegetale

Frutta e verdura presentano diversi livelli di pH e per questo si può dividere in 2 sottocategorie:

> alimenti a bassa acidità (pH ~ 5,5)

Maggior parte della verdura

> alimenti ad alta acidità (pH < 4,5)

es eccezione è melone (pH > 4,5)

Maggior parte della frutta, che quindi per i suoi livelli di pH risulta inattaccabile dai micro patogeni. La frutta è più acida in quanto deve difendere il seme al suo interno, parte più preziosa per la pianta. Piccoli frutti (mirtilli, ribes) ha pH ~ 3-3,5

2• alimenti di origine animale

Sono caratterizzati da un pH vicino alla neutralità (tra 6 e 7) e quindi sono un ambiente favorevole per lo sviluppo dei micro. Per i prodotti trasformati, come yogurt o formaggi, il pH risulta inferiore in quanto il lavoro attuato dai batteri lattici lo va a diminuire.

Quando un animale muore il pH può variare in modo diverso nella carne:

> carni di animali: durante la conservazione si ha la frollatura e il pH tende a diminuire

Questo in quanto le cellule fermentano = poiché non arriva più O_2 alle cellule, queste cercano comunque di produrre energia e lo fanno con una fermentazione lattica che converte il glicogeno (polisaccaride di riserva) in acido lattico. È la stessa cosa che avviene se chiediamo uno sforzo superiore ai muscoli rispetto a quello che l'O_2 introdotto può dare e quindi si forma acido lattico che da crampi.

> carni di pesce: quando l'animale muore i micro presenti nelle squame iniziano a lavorare e producono diversi composti, uno dei più frequenti sono le ammine, derivanti dalla decarbossilazione degli ammino, che innalzano il pH favorendo quindi lo sviluppo microbico. Il lavoro di questi micro produce anche sostanze volatili che danno il brutto odore al pesce ed è quindi fondamentale mantenere la catena del freddo.

vedi pg in fondo

Sono pochissimi gli alimenti con pH > 7 (albume, gamberetti ma di poco sopra 7), mentre la maggior parte ha pH < 7 quindi consideriamo solamente questi valori, non quelli sopra il 7.
Per rendere sicuro un alimento con pH > 4,5 posso abbassare il pH in due modi:

I • aggiungo dei micro in grado di abbassare il pH
Questo viene fatto per esempio nel caso della fermentazione lattica degli yogurt o form.

II • aggiungo delle sostanze che abbassino il pH
Devo aggiungere degli ACIDI perché questi dissociandosi liberano H^+
↓
non posso usare acidi forti, come acido cloridrico HCl, perché questi si dissociano completamente: $HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$
Aggiungendoli aumento di molto la concentrazione di H^+ però so che la membrana cellulare è completamente impermeabile (x storia forza proton-motrice) a H^+ e quindi non li fa entrare. Li farebbe entrare se la loro concentrazione fosse elevatissima ma ciò è possibile solo se abbasso drasticamente il pH (così l'alimento diventa immangiabile) aggiungendo molto HCl (l'alimento diventa così tossico). Per risolvere questo problema si possono utilizzare acidi organici (=acidi deboli) che si dissociano parzialmente:

(acido acetico) $CH_3COOH \rightleftharpoons H^+ + CH_3COO^-$

Nell'ambiente si ha quindi una parte dissociata, che aumenta la concentrazione di H^+ ma che essendo carica non può attraversare la membrana cellulare, e una parte indissociata che, essendo neutra e ricca di ~~sostanti~~ elementi utili per la cellula, attraversa la membrana ed entra nella cellula. Una volta dentro però la parte indissociata si dissocia aumentando la concentrazione di H^+ e quindi abbassando il pH.
Più acido indissociato entra nella cellula più se ne dissocia e quindi bastano anche quantitativi minimi di acidi deboli per andare ad abbassare il pH.
Di solito si utilizzano l'acido acetico o l'acido citrico.

condizionamento: capacità che un ceppo ha di offrire una maggiore resistenza ad un ostacolo quando questo varia in modo graduale.

Batteri
Micro NON patogeni che si sviluppano a pH < 4,5 sono il Lactobacillus, presente nei prodotti fermentati come i formaggi, e l'Acetobacter, micro che produce l'aceto degradando l'alcol etilico del vino.

B AW

D: parametro che indica il quantitativo di H_2O disponibile per le reazioni chimiche.

l'acqua è indispensabile per la vita ed è infatti il principale componente delle cellule, che ne contengono il 65-66% → circa i 2/3!!

le funzioni svolte dall'acqua sono:

- componente principale delle cellule
- solvente: permette che al suo interno si sciolgano determinate sostanze
- trasportatore: permette il movimento di molecole e cellule
- reagente: partecipa alle reazioni di idrolisi = reazione di depolimerizzazione attuata dalle cellule per staccare i singoli monomeri (es: glucosio) dal polimero (es: amido).

L'acqua, pur essendo fisicamente presente, può risultare non utilizzabile dall'organismo e per questo parliamo di acqua disponibile, calcolata con il parameto AW = attività dell'H_2O

→ $AW = \frac{P}{P_0} = \frac{\text{tensione di vapore dell'}H_2O\text{ in soluzione}}{\text{tensione di vapore dell'}H_2O\text{ pura}}$

con $0 < AW < 1$ ADIMENSIONALE (perché rapporto tra 2 grandezze omogenee)

- 0: nessun quantitativo di H_2O a disposizione. È un valore teorico, non raggiungibile nella realtà perché dovrebbe essere $P=0$
- 1: massima disponibilità dell'H_2O presente. la si ha quando $P=P_0$ e quindi quando ci sono solo molecole d'H_2O, quando vi sono solo forze intermolecolari che la trattengono (negli alimenti, invece, vi sono anche dei soluti che trattengono l'acqua quindi sempre $AW < 1$)

L'acqua è una molecola polare = molecola neutra (ha uguale n° di cariche + e di cariche −) ma sulla superficie le cariche non sono disposte in modo omogeneo, ma le cariche + si accumulano verso gli idrogeni mentre quelle − verso l'ossigeno. Questo trasforma la molecola in un dipolo (= come una calamita che ha una estremità carica + e una carica −) e per questo va a creare dei legami con le altre molecole d'acqua che determinano lo stato liquido di questa sostanza.

le molecole vibrano, si spostano continuamente urtandosi. Al centro del liquido, poiché le molecole sono molte, queste non si spostano molto ma sulla superficie la questione è diversa: le molecole hanno un maggior grado di libertà e se si spostano verso l'alto vanno a distaccarsi dalle altre molecole per poi essere nuovamente richiamate verso il basso dalla forza delle altre molecole.

Se però la molecola che si muove verso l'alto ha una forza abbastanza grande questa riesce a non venire richiamata dalla forza delle altre molecole e permane come vapore.

Questo avviene se c'è solamente H_2O pura ma se nell'H_2O inserisco altre molecole che presentano una forza maggiore nel trattenere l'acqua sarà sempre minore il n° di particelle d'acqua che evaporano. Posso per esempio inserire:

> molecola polare con polarità più forte (come gli zuccheri)

> molecole cariche (come il sale, con ancora maggiore forza).

Dando più energia al sistema le molecole di acqua hanno una forza maggiore per staccarsi dal liquido e quindi sempre più molecole evaporano perché con l'aumento dell'energia le molecole vibrano sempre più e non riescono più a rimanere unite quindi evaporano.

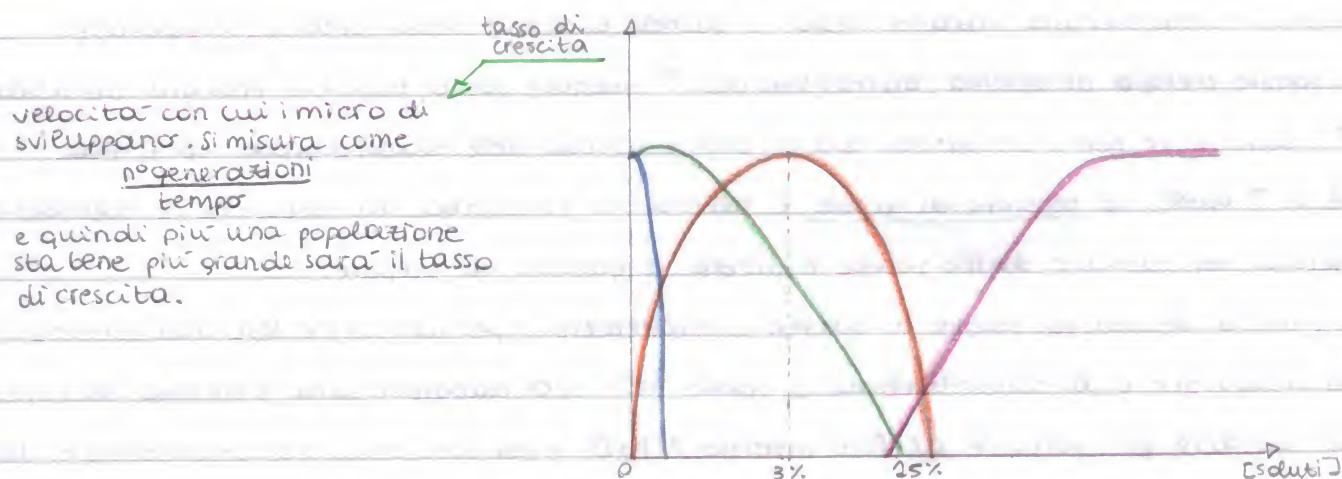
Togliendo invece energia vibrano meno e quindi avranno meno forza per evaporare.

Posso fornire energia al sistema aumentando T, mentre posso togliere energia abbassando T. Comunque non si arriva mai ad un blocco totale dell'evaporazione, continua anche a T basse. La tensione di vapore è allora la tendenza, la forza che le molecole di H_2O hanno per passare dallo stato liquido a quello di vapore.

Anche i micro devono far fronte a queste considerazioni per acquisire H_2O dall'esterno: infatti maggiore è la concentrazione di soluti nell'H_2O maggiore sarà l'energia che i micro devono spendere per portare al loro interno l'H_2O e nel caso in cui la concentrazione dei soluti risulti molto elevata (soluzione ipertonica) il micro si disidrata, in quanto l'H_2O viene richiamata all'esterno. I micro possono reagire in maniera diversa alla scarsa disponibilità d'H_2O: i batteri sono più sensibili (e in particolare i gram− sono i più sensibili mentre i gram+ lo sono un po' meno per la loro struttura) mentre i funghi, come lieviti ma n[H] muffe, sono più resistenti alla carenza d'H_2O e si sviluppano a qualsiasi livello di AW (x qst sn probl. x conservazione farine) (ad eccezione di quando c'è tutta H_2O, cioè quando c'è un ambiente acquatico, perché lì non c'è O_2 e i funghi come le muffe sono aerobi !!).

I micro allora presentano comportamenti diversi in base alla concentrazione di soluti:

- micro non alofili: sopporta malissimo la presenza di soluti e infatti appena aumenta la loro concentrazione il tasso di crescita cala drasticamente (non significa che i micro muoiono ma bloccando il metabolismo si blocca la crescita).
  Sono moltissimi gram−, come E. coli.

- micro <u>alotollerante</u>: micro che starebbero meglio a concentrazioni minori ma che comunque si sanno adattare. L'aumento dei soluti arresta la crescita ma in maniera meno drastica rispetto al caso precedente
  Es. Staphylococcus aureus
- micro <u>alofili</u>: amano, gradiscono una certa concentrazione di soluti e quindi resistono bene in condizioni di scarsità d'H_2O. Presentano una crescita ottimale quando la concentrazione di soluti è 3% (30 gr x l) e questo avviene nell'H_2O marina.
  Es. Vibrio (vibrio colerae riesce a svilupparsi anche in H_2O dolce)
- micro <u>alofili estremi</u>: vive con concentrazioni saline del 15-30% quindi diminuendo la concentrazione di soluti muoiono (scoppiano)

I micro riescono a trattenere l'H_2O al loro interno, riescono ad opporsi alla forza con cui i soluti esterni richiamano l'H_2O in quanto anche al loro interno vi sono dei soluti che la richiamano e questi sono detti <u>soluti compatibili</u> (compatibili con metabolismo micro). Sono:

- zuccheri: come saccarosio (no glucosio perché usato come fonte energia)
- aminoacidi: solo quelli polari
- alcooli: come mannitolo e glicerolo
- sali: attuano una azione più forte e sono utilizzati n° dagli alofili estremi

(zuccheri, aminoacidi, alcooli: molecole polari, soluti più abbondanti)

<u>xerofili</u> = micro che amano il secco, la scarsità d'H_2O

<u>osmofili</u> = micro che sopportano grandi pressioni osmotiche (generate dalla presenza di soluti)

In ambito alimentare non si arriva mai ad un livello inferiore a 0,5 di AW, si hanno sempre dei valori più elevati. Per quanto riguarda i batteri, essi non si sviluppano a livelli di AW < 0,9 e quello più resistente è lo Staphylococcus aureus che può arrivare fino a 0,86 - 0,89. A livelli di AW < 0,9 posso invece svilupparsi i lieviti, le muffe e i batteri alofili estremi (non rilevanti però dal punto di vista degli alimenti).

Il problema però sta nel fatto che gli alimenti naturali (non soggetti a trattamenti tecnologici) presentano valori di AW molto elevati e tutti molto superiori a 0,9 e quindi questo favorisce lo sviluppo dei batteri.

Tra gli alimenti si osserva che i prodotti liquidi (come latte, AW = 0,995) e i prodotti solidi (come manzo, AW = 0,990) hanno parametri molto simili di AW e questo non è affatto strano. Anche se quelli liquidi hanno sicuramente un quantitativo maggiore di molecole d'H_2O, l'AW mi indica il n° di molecole a disposizione e quindi in percentuale si avrà lo stesso n° di molecole d'H_2O a disposizione, anche se i prodotti solidi di per sé presentano un minor quantitativo d'H_2O.

Es: pane — $- H_2O$ presente — AW = 0,950 → $+ H_2O$ a disposizione !!
marmellata — $+ H_2O$ presente — AW = 0,800 → $- H_2O$ a disposizione !!

In generale: AW > 0,9 → alimenti freschi come frutta, verdura, latte, pesce, carne e prosciutto (anche se è un prodotto salato ha comunque AW alta in quanto serve una quantità elevata di soluti per abbassare AW)

AW < 0,9 → alimenti trasformati. Tecnologicamente per abbassare AW posso:

1. aggiungere soluti: questi soluti possono essere:
   - molecole polari (zuccheri)
   - molecole cariche (sale)

   Sono entrambi efficaci ma hanno una efficienza diversa (è più efficiente il sale). Si osserva infatti che, per abbassare AW di un bicchiere d'H_2O da 1 a 0,99 servono 1,75 gr di NaCl e 11 gr saccarosio !!
2. diminuire il solvente: diminuendo il solvente la concentrazione dei soluti aumenta. Questo spiega come mai prodotti con meno H_2O hanno anche AW più bassa, perché nell'H_2O che c'è è maggiore la concentrazione di soluti. Posso diminuire il quantitativo d'acqua con:
   - essicamento: con T elevate faccio evaporare
   - congelamento: H_2O da liquida a solida

In base a AW gli alimenti possono essere suddivisi in:

a. **HMF**: alimenti ad umidità elevata. Hanno 0,9 < AW < 1 e sono attaccati dai batteri.
   2 sottocategorie
   - altamente deperibili: 0,95 < AW < 1 prodotti freschi
   - deperibili: 0,9 < AW < 0,95 alimenti + salati e zuccherati

b. **IMF**: alimenti ad umidità intermedia. Hanno 0,6 < AW < 0,9 e sono attaccati da muffe o lieviti

c. **LMF**: alimenti ad umidità bassa. Hanno 0 < AW < 0,6 e non sono attaccabili, solo se vengono reidratati

C POTENZIALE REDOX

D: tendenza di un ambiente ad acquisire elettroni

Le reazioni di ossidoriduzione vengono sfruttate dalla cellula per produrre energia in quanto per ricavare energia dalle molecole le si deve ossidare (= togliere elettroni).

Gli elettroni ceduti dalle molecole vengono acquisiti da diversi accettori e quello più efficiente, cioè quello che mi permette di ricavare più energia dalle molecole, è l'O_2.

Non tutti i micro sanno però utilizzare O_2 oppure se lo sanno usare può essere assente e proprio per sormontare questi ostacoli i micro hanno attuato diverse soluzioni che gli permettano comunque di ricavare energia. In base alla loro capacità di produrre energia, i micro possono essere suddivisi in 5 categorie, individuate con il seguente esperimento: si prendono 5 tubi con all'interno un mezzo di crescita non completamente agarizzato (= semi solido). Quando i micro vengono inseriti nei tubi, si sviluppano a formare delle colonie che presentano forma sferica in quanto possono svilupparsi in qualsiasi direzione essendo il mezzo non solido. Nel mezzo di crescita viene poi inserita una sostanza che non renda più disponibile l'O_2 e quindi l'O_2 presente è pochissimo e con un gradiente decrescente dalla superficie verso il fondo del tubo. Posso fare questa affermazione utilizzando un indicatore redox, la resazzurrina: liquido che quando entra a contatto con O_2 è rosa, se invece non c'è ossigeno perde la colorazione. Nei tubi si osserva che il colore è rosato verso la superficie del mezzo ma scendendo si ha una rapida perdita della colorazione in quanto non c'è più O_2.

Inserendo i micro (i micro sn su tt volume!!) nei mezzi si osservano 5 comportamenti diversi nell'approvvigionamento energetico:

1- AEROBI OBBLIGATI O STRETTI

I micro sviluppano delle colonie solamente sulla superficie del mezzo e questo perché necessitano obbligatoriamente di O_2 per svilupparsi. Se non c'è O_2 possono morire o, più probabilmente, bloccano il loro sviluppo. Hanno infatti bisogno di O_2 non per vivere ma per svilupparsi!! Non vi è nessun batterio patogeno che fa parte di questa categoria (per questo un alimento sottovuoto NON è per forza sicuro!!). Esempi sono le muffe e infatti le si osservano solamente sulla superficie dei prodotti (eccezione è il gorgonzola: le spore di muffe sono inserite nel latte prima di produrre il formaggio e quindi sono presenti su tutto il volume. Si sviluppano però solamente in alcune zone in quanto con spilloni si creano dei canali nella forma che permettano l'entrata di O_2 e quindi lo sviluppo di muffe).
Altri esempi sono i batteri acetici (trasformano l'alcol in acido acetico).
Tutti questi micro si ricavano l'energia con la respirazione aerobica.

2- ANAEROBI STRETTI o OBBLIGATI

I micro si sviluppano verso il fondo della provetta poiché il loro sviluppo è inibito dalla presenza di O_2 e quindi vi stanno il più lontano possibile. Il loro metabolismo energetico può essere la respirazione anaerobica o la fermentazione. Per questi micro l'O_2 è TOSSICO e quindi esponendoli all'O_2 muoiono. Vi sono dei patogeni alimentari, come Clostridium botulinum e perfringens, ma vi sono anche dei micro non patogeni, come i batteri lattici (es: Lactobacillus vulgaricus, usato per produrre lo yogurt).

3- AEROBI FACOLTATIVI o ANAEROBI FACOLTATIVI

Questi micro possono svilupparsi sia in presenza che in assenza di O_2. Nel tubo allora crescono su tutto il volume ma si osserva una maggior concentrazione di colonie verso la superficie, dove vi è più O_2, in quanto la respirazione aerobica permette di ricavare molta più energia rispetto alla fermentazione e alla respirazione anaerobica. È la categoria più affollata per quanto riguarda i patogeni alimentari e quindi ciò dimostra che togliere O_2 ad un alimento, mettere sottovuoto, non ostacola lo sviluppo di un gran numero di micro e quindi non rende sicuro un alimento. Oltre ai patogeni vi sono anche dei lieviti, come Saccaromices cerevisiae, importanti per le trasformazioni tecnologiche.

4- MICROAEROFILI

Nelle provette si sviluppano dove c'è O_2 ma non si sviluppano sulla superficie perché lì ve ne è troppo. Come noi che viviamo con ~20% O_2 in aria (se ce ne fosse di più sarebbe per noi tossico), questi micro si sono abituati a vivere in un ambiente con una concentrazione minore di O_2 rispetto a quella atmosferica e quindi attuano comunque la respirazione aerobica ma necessitano di concentrazioni minori di O_2.
Esempi nel settore alimentare è il genere Campylobacter mentre nel settore agricolo è il Rhyzobium, micro che crea dei noduli nelle radici delle leguminose.

5- ANAEROBI AEROTOLLERANTI

I micro crescono su tutto il volume del mezzo di coltura: questi micro non utilizzano l'O_2, quindi fermentano o attuano la respirazione anaerobica, ma per loro non è tossico e quindi si sviluppano bene anche dove l'O_2 è abbondante. (È come per noi l'azoto, abbondante in aria ma per noi non tossico). Vi sono alcuni ceppi di patogeni che col tempo sono diventati aerotolleranti e vi sono poi i batteri lattici (come Streptococcus termofilus, usato assieme al Lactobacillus vulgaricus per produrre lo yogurt).

In generale si possono individuare 2 categorie principali di micro:

- usano O_2 ⟶ aerobi obbligati
  aerobi facoltativi
  microaerofili
- non usano O_2 ⟶ anaerobi stretti
  anaerobi aerotolleranti

Il potenziale redox si misura in mV e può essere:

- positivo: si ha un ambiente ossidante (= acquisisce e^-) e quindi sono disponibili accettori
- negativo: si ha un ambiente riducente (= cede e^-) e quindi non vi sono accettori disponibili e questo ostacola sia la respirazione aerobia che quella anaerobia (poiché anch'essa ha bisogno di accettori !!).

L'attività dei micro può modificare il potenziale redox dell'ambiente !! Se prima il potenziale redox era ostile può diventare favorevole, così come se prima era favorevole può diventare ostile a seguito dell'azione dei micro. Questo vale n^H nei processi di trasformazione dove è necessario lo sviluppo di micro (es: fermentazione salame = salume (alimento a base di carne conservato con l'uso di sale) fatto di carne macinata cruda che è andato incontro a fermentazione. Durante la fermentazione prima si sviluppa i micro aerobi perché c'è O_2 però poi O_2 inizia a scarseggiare e quindi si sviluppa anaerobi facoltativi e quando O_2 finisce si sviluppa anaerobi obbligati).

L'O_2 è TOSSICO per le cellule !! In particolare 5 molecole di O_2 ogni 100 che respiriamo sono ROS (= Reactive Oxygen Species = forme tossiche O_2) e sono tossiche in quanto radicali liberi (molecole a cui manca $1e^-$ per completare l'otteto)

↳ molecole molto reattive, che sono in grado di ricavare $1e^-$ in modo molto rapido. Si formano sulla membrana cellulare quando la catena di trasporto degli elettroni non va a buon fine e più radicali si formano più cala l'efficienza della membrana. Col tempo si ha allora una perdita di efficienza e quindi i radicali liberi sono i diretti responsabili dell'invecchiamento cellulare poiché vanno a danneggiare la membrana cellulare. Oltre che da eventuali errori nella catena di trasporto degli e^-, i radicali liberi si possono formare a seguito dell'esposizione a radiazioni ionizzanti o possono essere prodotti dai macrofagi (li produce per uccidere ciò che inglobano).

I micro possono o meno presentare dei meccanismi di difesa contro i radicali liberi: i micro aerobi, costantemente a contatto con O_2 e con ROS, presentano delle difese, così come gli anaerobi facoltativi che, pur non utilizzando l'O_2, sono in grado di detossificare le molecole che si formano. I micro anaerobi stretti, invece, che non sono mai venuti a contatto con O_2, non presentano difese e quindi l'eventuale contatto con O_2 o ROS gli uccide.

I ROS che si possono formare sono:

- O_2^- — $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ — il più diffuso — radicale superossido
- H_2O_2 — $O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ — acqua ossigenata o perossido di idrogeno
- OH^- — $H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^-$ — radicale ossidrile, il più reattivo

I meccanismi di difesa contro questi radicali liberi sono:

a. sostanze antiossidanti

Sostanze che si ossidano andando così a ridurre i radicali liberi. Ciò evita che i radicali vadano ad ossidare altre sostanze.

b. perossidasi $H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2H_2O + NAD^+$

Enzimi che degrada H_2O_2 utilizzando NADH cm fonte di elettroni
Utilizzato come test per verificare se i micro sono capaci di detossificare i ROS.

c. catalasi $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Meccanismo che utilizza un enzima, la catalasi, in grado di scindere H_2O_2, e che è presente nei micro che vivono in presenza di O_2. Anche questo è utilizzato come test per verificare se i micro sono capaci di detossificare i radicali liberi. Il test consiste nel prendere una goccia di H_2O_2 e di inserirvi all'interno dei micro: se questi micro sono in possesso di catalasi, quest'enzima attacca H_2O_2 portando alla sua "frittura" = si hanno bolle di O_2 che si liberano, assieme a H_2O, e che fanno ribollire l'acqua ossigenata. Se si ha la frittura di H_2O_2 il micro è definito catalasi positivo, se invece non si formano le bolle il micro è definito catalasi negativo. Questa classificazione è importante perché se positivo si tratta di un micro che si sviluppa in presenza di O_2 o che comunque lo sopporta, riesce a vivere in presenza di O_2, se negativo non si sviluppa in presenza di O_2.

D T

D: misura del calore, che è a sua volta una misura dell'energia cinetica delle particelle (= velocità con cui si muovono le molecole).

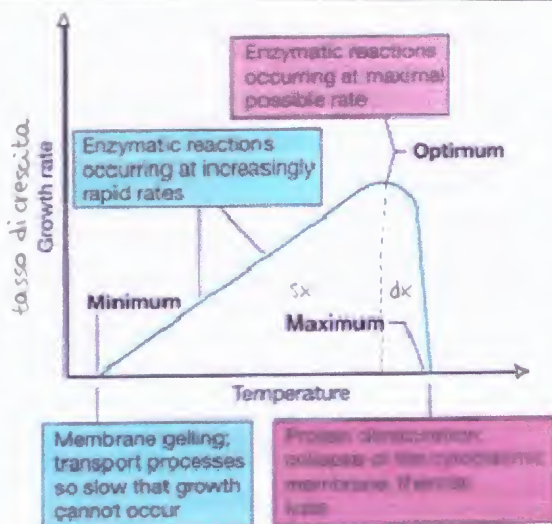
la cellula per vivere ha bisogno sia di energia cinetica (= energia necessaria per il trasporto di molecole, data dal calore) che di energia potenziale (= energia ricavata dal glucosio). la velocità con cui le molecole si muovono ha una dipendenza diretta con la T : + T + velocità delle molecole + lavoro delle cellule + sviluppo cellulare

− T − velocità delle molecole − lavoro delle cellule − sviluppo cellulare

Questo però vale entro certi limiti : continuando ad abbassare T si arriva ad un certo punto in cui il trasporto delle molecole si blocca e quindi si blocca anche lo sviluppo cellulare. Continuando, invece, ad aumentare T si arriva ad un certo limite in cui le molecole vibrano così tanto che qualcosa si rompe, l'energia apportata è eccessiva e ciò comporta una drastica diminuzione del tasso di crescita.

la T influisce allora su:

- stato fisico dell'acqua: è importante che sia liquida per intervenire nelle reazioni
- velocità delle reazioni : questo comporta effetti sulla crescita e sulla sopravvivenza

Consideriamo il grafico che indica l'effetto di T sullo sviluppo microbico:

Nel grafico ad ogni T corrisponde un diverso tasso di crescita e i valori sono ricavati facendo crescere a T diverse delle colture diverse dello stesso micro.

Nella parte sinistra del grafico viene rispettata la proporzionalità diretta tra T e velocità di crescita : + T + velocità di crescita e − T − tasso di crescita. Il punto in cui il grafico interseca l'asse x indica la T a cui lo sviluppo microbico si arresta ed è definita T minima di crescita. Dopo questo valore il grafico poggia sull'asse x perché lo sviluppo rimane bloccato. Dal grafico si possono ricavare 3 T importanti, dette T cardinali, che descrivono il comportamento termico dei micro:

- T minima: T al di sotto della quale la popolazione microbica non si sviluppa
- T massima: T al di sopra della quale la popolazione microbica non si sviluppa
- T ottimale: T a cui tutto funziona alla massima velocità = il tasso di crescita è massimo

Da Tminima a Tottimale viene rispettata la proporzionalità diretta tra T e velocità di crescita ma da Tottimale a Tmassima si osserva che l'aumento di T comporta una diminuzione della crescita: questo poiché si sta dando troppa energia ai microbi e quindi gli enzimi più termo= labili subiranno una rottura per l'eccessiva vibrazione delle molecole e ciò implica un rallentamento della crescita. Il rallentamento è brusco, non graduale come nella parte sinistra del grafico, poiché l'enzima che si è rotto era fondamentale per la crescita e un ulteriore aumento di T comporta la rottura di più enzimi e quindi lo sviluppo cala sempre più fino ad azzerarsi.

Se conservo un alimento a T superiore a Tmassima o inferiore a Tminima il risultato sarà uguale: lo sviluppo microbico si blocca. Quando però riporto l'alimento ad una T di sviluppo si hanno due comportamenti diversi:

> quando riporto T al di sotto di Tmassima, i micro non si sviluppano ugualmente e quindi questo trattamento a T elevate ha effetto battericida = quando cuocio uccido tutti i micro

> quando riporto T al di sopra di Tminima, i micro si sviluppano e quindi questo trattamento a T basse ha effetto batteriostatico = quando refrigero blocco solo la crescita, non uccido i micro.

Si distinguono diverse categorie di micro in base alle loro diverse T cardinali:

1 PSICROFILI

Micro amanti del freddo e infatti presentano Tmassima = 15-20 °C e sono quindi micro ad habitat polare. Non sono importanti dal punto di vista alimentare perché questi micro non sopravvivono ai nostri climi e quindi non possono inquinare i prodotti.

2 PSICROTROFI e MESOFILI

Queste due categorie hanno delle caratteristiche comuni, come per esempio la Tottimale di sviluppo (20-30 °C per i primi, 25-45 °C per i secondi) (∼37 °C x 1° isolati in intestino), e sono importanti dal punto di vista alimentare perché si sviluppano bene alla nostra T, al nostro clima.

Si distinguono però per la Tminima: gli psicrotrofi si sviluppano a T ≤ 0 °C mentre i mesofili a T > 10-15 °C e ciò ha importanti ricadute pratiche: alla T di refrigerazione (4 °C) del frigorifero gli psicrotrofi possono svilupparsi mentre i mesofili no.

Queste sono le categorie più importanti a cui appartengono i batteri d'interesse alimentare.

psicrotrofi: Clostridium botulinum, Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes, Bacillus, lieviti

mesofili: Salmonella, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, batteri lattici

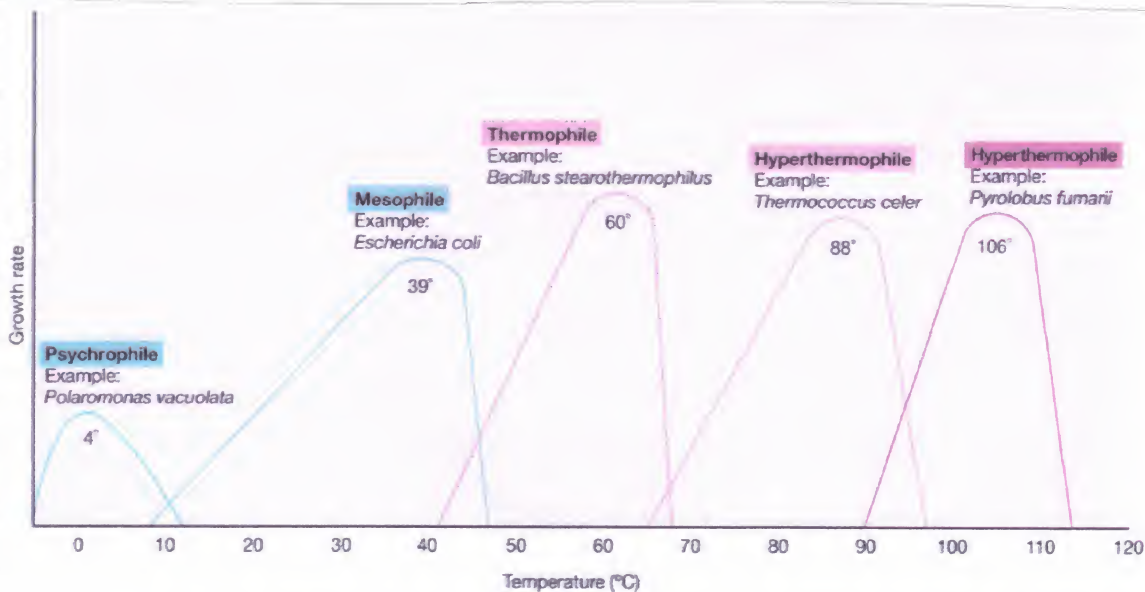
↳ micro ad abitat intestinale e con attività degradativa.

3 TERMOFILI

Micro che amano il caldo e infatti Tminima = 40-45 °C !! Solamente uno è importante dal punto di vista alimentare però raggruppano molti micro di interesse tecnologico (es: Streptococcus termofilus e lactobacillus vulgaricus nello yogurt, fatto a 42-45 °C).

Si distinguono termofili stretti, che si sviluppano a T = 40-45°C, e termofili in senso lato, che invece si sviluppano anche a T leggermente inferiori a 40°C.

4 IPERTERMOFILI

Sono estremofili in quanto vivono a T molto elevate. Non sono micro di interesse alimentare ma di elevato interesse biotecnologico: questi micro sono a loro agio a T ≥ 100 °C e quindi i loro enzimi sono in grado di lavorare a queste T elevate, cosa che gli altri non sanno fare perché a queste T si denaturano. Questi enzimi termoresistenti sono allora molto utilizzati nelle lavorazioni ed uno importante è la TAC-polimerasi: enzima che attua la reazione di PCR (= reazione di amplificazione degli acidi nucleici = reazione che permette di moltiplicare il DNA).

I micro non hanno capacità omeostatica (= non sono in grado di mantenere costante un parametro indipendentemente dalle condizioni esterne) nei confronti della T, però l'evoluzione ha fatto sì che i micro sviluppino determinati meccanismi per risolvere questa situazione. Per esempio i micro hanno una diversa composizione della membrana cellulare così da poter mantenere la fluidità anche a T molto alte o molto basse.

I lipidi della membrana sono molto sensibili a T: -T +solidi, +T + fluidi. la membrana deve comunque sempre mantenere una certa fluidità e questo è stato risolto in modo diverso nei micro: gli psicrofili presentano abbondanza di acidi grassi insaturi (come quelli dell'olio che sono liquidi a T basse) nella membrana, mentre negli ipertermofili e nei termofili si ha abbondanza di acidi grassi saturi (come quelli del burro che +T + fluidi).

micro termotolleranti: o termodurici, sono dei micro mesofili che comunque sono in grado di sopportare trattamenti blandi a T medio-alte (n^{H} resistono alla pastorizzazione).

Con T elevate è molto facile uccidere i micro però:
- non tutti gli alimenti sono sottoposti a trattamenti termici;
- è indispensabile che la T elevata colpisca direttamente il micro;

Si possono allora identificare delle zone di sicurezza per gli alimenti:
- $T < 4°C$ si sviluppano comunque gli psicrofili ma lo fanno molto lentamente
- $T > 60°C$ i micro muoiono o comunque non si riproducono

la zona intermedia a queste due T è una zona di pericolo e quindi gli alimenti devono permanervi il meno possibile, massimo 2-6 ore. Questo vale però per gli alimenti il cui unico o più importante parametro di controllo dello sviluppo microbico è la T, quindi per esempio non vale per i craker, che hanno AW così bassa che può essere conservati a T ambiente senza rischio di contaminazione.

Termoresistenza dei micro

È importante conoscere la termoresistenza dei micro poiché ciò ci permette di regolare al meglio il trattamento termico da attuare, così da evitare:
- sprechi di energia
- danneggiamento del prodotto

Vi sono vari parametri che descrivono la termoresistenza, ma noi studieremo:

(A) TEMPO DI RIDUZIONE DECIMALE D_x

D: tempo per cui bisogna far sottostare l'alimento ad una certa T, indicata con X, per ottenere una riduzione decimale della popolazione (= muore 90% micro = si riduce di un logaritmo la carica microbica = sopravvive il 10% della popolazione).

$$D_x = \frac{t}{\log N_{iniziale} - \log N_{finale}}$$

con t = tempo di trattamento

N = n° di micro della popolazione

Questa formula deriva dalla prima equazione di Bigelow, secondo cui:

$$\log \frac{N_0}{N_f} = \frac{t}{D}$$

Si osserva che ogni volta che riduco di 10 volte la popolazione si ha che il tempo di trattamento t è pari al tempo di riduzione decimale D. Infatti:

$$\log\left(\frac{1000}{100}\right) = \frac{t}{D}$$

$$\log 10 = \frac{t}{D}$$

$$1 = \frac{t}{D} \longrightarrow t = D$$

Questo vale qualsiasi sia il valore di N_0 e quindi si può affermare che D NON dipende dalla carica iniziale !!

Spesso si indica D_x perché si considera il tempo di riduzione decimale ad una determinata T, indicata nel pedice x, che solitamente risulta:

- $x = 50-70$ °C per le forme vegetative
- $x = 80-130$ °C per le spore

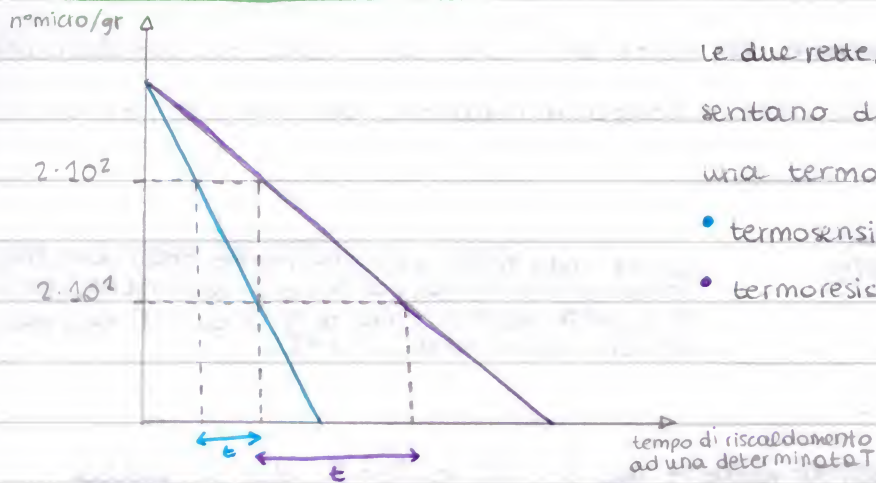
Consideriamo che il tempo di riduzione decimale di un micro alla T di 65°C sia di 20 secondi. Possiamo osservare come il tempo di trattamento t dipende dalla carica microbica iniziale. Infatti:

$$D_{65} = 20''$$

$$10^6 \longrightarrow 10^5 \qquad t = 20''$$

$$10^6 \longrightarrow 10^4 \qquad t = 40''$$

Se non si conosce la carica microbica iniziale si attua il trattamento più drastico così da essere sicuri di aver eliminato gli eventuali micro presenti. Devo però fare ciò considerando quali micro possono essere presenti perché se vi sono micro non patogeni possono anche permanervi alcuni nel prodotto mentre se vi sono dei patogeni devo eliminarli tutti per garantire la sicurezza dell'alimento.

- CURVA DI SOPRAVVIVENZA -

Le due rette, che presentano diversa pendenza, rappresentano due diverse categorie di micro che hanno una termoresistenza diversa:

- termosensibile = − t per una riduzione decimale
- termoresistente = + t per una riduzione decimale

I diversi micro presentano diversi tempi di riduzione decimale e, in particolare, si ha:

- batteri vegetativi: a 55-65 °C 0,2 min < t < 2 min
- micro termosensibili: D_{65} = 0,1 (E. coli)
- micro termodurici: D_{65} = 5-30 min (enterococchi)
- spore: alcune ore a 100 °C, alcuni minuti a 120 °C
- lieviti e muffe: come i batteri vegetativi

N.B. 65 °C = T pastorizzazione
121 °C = T sterilizzazione

Il tempo di riduzione decimale varia però in base a diversi fattori, quali:

> stato metabolico: se il micro è in forma vegetativa o è una spora

> fase di crescita: se si sta accrescendo è più termosensibile perché impegnato in molte attività

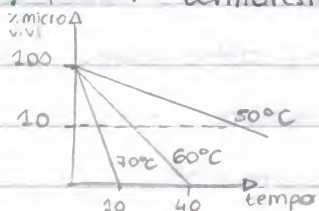
> pH: se è basso la termoresistenza è minore poiché il micro è impegnato ad ostacolare l'acidità

> H_2O: se vi è poca acqua si ha maggior termoresistenza poiché l'H_2O conduce meglio il calore

> presenza di sostanze protettive: per esempio il micro può avere degli strati di lipidi o di polisaccaridi che lo proteggono e quindi aumentano la termoresistenza. È importante sapere in che alimento si trova il micro poiché in base alla composizione dell'alimento varia anche il tempo di riduzione e in particolare + soluti (come zucchero) + tempo perché − diffusione del calore.

> T: + T − termoresistenza quindi − tempo di riduzione decimale ma non si ha una relazione lineare tra T e t

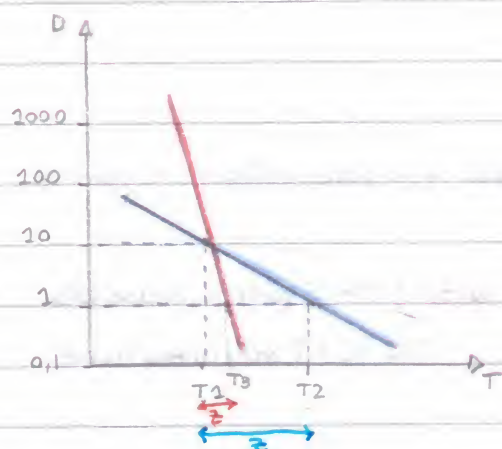
% micro vivi; 100; 10; 50 °C; 60 °C; 70 °C; 10; 40; tempo

> carica microbica iniziale

N.B. Spesso nelle pubblicità si sente "ridotto del 99% i micro" ma questa non è un'info significativa, mi dice solamente che sono stati fatti 2 tempi di riduzione decimale. Se non so la carica iniziale questa info non mi dice niente!!!

(B) Z

D: variazione di T necessaria a provocare la morte dei micro dieci volte più rapidamente necessaria cioè ad abbassare di dieci volte il tempo di riduzione decimale D, ad avere una variazione di D di 1 log.

$$\rightarrow z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2}$$

poiché $D_1 = 10 D_2$ la differenza tra i due log sarà sempre pari a 1, ciò dimostra che z è una differenza di T e quindi la sua unità di misura è il °C.

volendo passare da $D_1 = 10$ a $D_2 = 1$, la z è data dall'intervallo tra le due T a cui si osservano i tempi di riduzione decimale considerati.

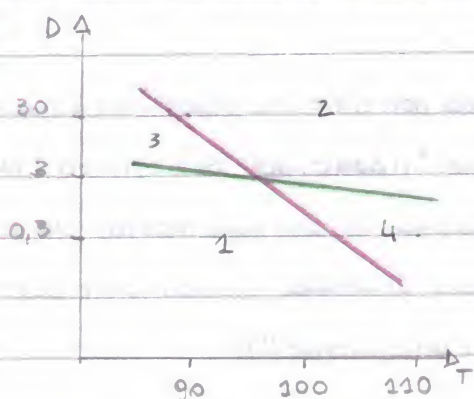
Si osserva che se il micro è termoresistente dovrò alzare di più la T per avere lo stesso effetto.

Per i micro termosensibili basta invece una piccola ΔT

Mediamente vi sono dei valori di riferimento per z nei micro:

> z = 5°C per le cellule vegetative

> z = 10°C per le spore. È un valore molto importante poiché le spore sono quelle più resistenti e sono quindi l'obiettivo principale dei vari trattamenti, perché una volta eliminate queste sicuramente avrò eliminato anche tutto il resto.

Le reazioni chimiche sono meno sensibili alle T elevate rispetto all'inattivazione dei micro, però si individua anche per esse un valore di z, poiché anche la loro azione dipende da T. Le reazioni possono avvenire con una velocità 10 volte superiore con valori medi di z = 20 - 50°C (si deve alzare la T di decine di gradi !!).

considero i valori di z per l'eliminazione di spore di un micro patogeno (z=10) e per una reazione chimica (qui degradazione delle vitamine, z=25). Si distinguono quattro zone:

zona 1: non elimino micro né distruggo la vitamina

zona 2: elimino micro ma distruggo anche vitamina

zona 3: non elimino i micro ma distruggo la vitamina

zona 4: elimino i micro ma non distruggo la vitamina

Ciò dimostra come le reazioni chimiche siano più sensibili a T basse per lunghi periodi che a T elevate, mentre i micro risultano più sensibili a trattamenti con T alte per poco tempo!!!!

(C) F

D: tempo di durata del trattamento necessario per abbassare la carica microbica di un valore definito.

$\rightarrow F = n \cdot D$
= n° di riduzioni decimali · tempo di riduzione decimale
$= (\log N_0 - \log N) \cdot D$

Questo è un parametro del tutto generale perché dipende dai diversi fattori da cui dipende D (T, tipo micro...). Si utilizza allora un valore più puntuale, più specifico

F_0 : indice di letalità o effetto sterilizzante equivalente

è il tempo necessario per abbassare la carica microbica, che presenta z = 10 (quello delle spore perché sono le più resistenti), operando a T = 121,1°C (T dell'autoclave, quella più alta che si raggiunge in questi processi).

Quando si calcola F_0 si considera il micro più pericoloso dal punto di vista alimentare: il Clostridium botulinum (gram + e sporigeno) che presenta $D_{121,1°C}$ = 0,21 min (12,6 s)

Il trattamento da applicare deve assicurare che il C. botulinum non sia presente e quindi si va a considerare il caso più remoto possibile per quanto riguarda la situazione iniziale.

ES: $N_0 = 10^{12}$ = mille miliardi = inverosimile !!

$N = 1$ $\qquad F = (\log 10^{12} - \log 1) \cdot 12,6\ s$

$D_{121,1} = 12,6\ s$ $\qquad F = (12 - 0) \cdot 12,6\ s$

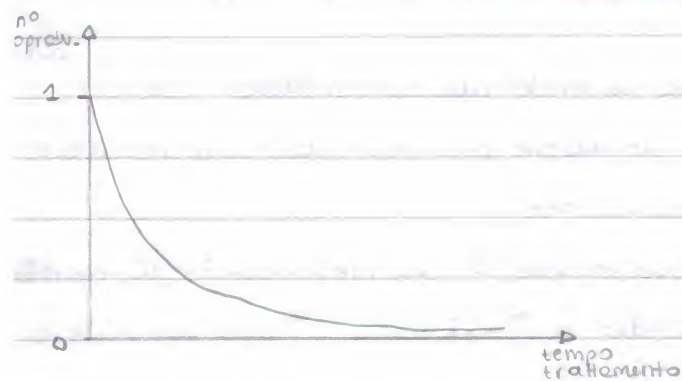
$F = 151,2\ s = 2,52\ min.$

N.B. Il trattamento deve essere applicato AL MICRO!! È il micro che deve stare a quella T per quel tempo quindi si deve prima ricavare il tempo necessario affinché quella T arrivi anche al micro !!!!

N.B. Il Clostridium botulinum NON presenta le spore più termoresistenti!! I micro che le presentano non sono però dei patogeni e per questo non vengono presi come riferimento. Questi micro sono solamente alteranti (possono rigonfiare le confezioni, cosa che C. non fa) e quello con spore più termoresistenti è il Bacillus stearothermophilus che però, essendo un vero termofilo (non sopravvive a T<40°C) non si sviluppa alle nostre T ma è un problema nei paesi tropicali.

Per eliminare queste spore più termoresistenti servono tempi di trattamento più lunghi.
(per B. stearothermophilus $D_{121} = 4,5$ min)

sterilità commerciale: trattamento a T = 121,1 °C con 12 riduzioni decimali che mi garantisce l'assenza di C. botulinum nel prodotto.

sterilità microbiologica: assenza di qualsiasi micro nell'alimento. In realtà la STERILITÀ ASSOLUTA NON ESISTE!!

Inizialmente si ha che $N_t = N_0$. Successivamente col procedere del trattamento N_t diminuisce del 90% ad ogni D, quindi:

100 → 10 → 1 → 0,1 → 0,01 ....

1 scatola ha 100 micro — 1 scatola su 10 ha 1 micro

Si osserva allora che non si arriva mai a 0 né sul grafico né matematicamente. Si arriva a ∞, quindi la probabilità di trovare i micro è molto bassa, però non raggiungo mai lo zero.

N.B. Spesso sulle confezioni è scritto "conservare in luogo fresco e asciutto" però questo è un ossimoro, un luogo fresco non sarà mai asciutto!!!!
Questo dipende dalla T che varia la solubilità dell'acqua nell'aria: se infatti T diminuisce meno molecole d'H_2O potranno rimanere nell'atmosfera. Le molecole riducono la loro velocità e ciò fa prevalere le forze di attrazione sull'energia cinetica, quindi le molecole di H_2O si aggregano e per il loro peso precipitano dando il fenomeno della condensa. Questo avviene nel frigo: quando apro la porta entra aria con T più alta (e quindi con al suo interno più molecole di H_2O) che nel frigo si raffredda = ci sta meno molecole di acqua = acqua precipita come condensa. Perciò un luogo fresco non è mai asciutto!! Quello spiegato sopra è detto principio della parete fredda

Teoria dei molti ostacoli: o hurdle technology. Consiste nel lavorare su più parametri contemporaneamente per ostacolare lo sviluppo micro

soluzione fisiologica: o soluzione di Ringer. Soluzione di acqua e sale allo 0,9% (9 gr/l) che risulta isotonica con i fluidi biologici.

famiglia **ENTEROBACTERIACEAE**

Famiglia molto importante perché comprende molti micro che sono interessanti per l'uomo e n^{H} per il suo intestino (sono infatti chiamati enterobatteri perché abitano nell'intestino umano). In questa famiglia vi sono però anche generi e specie che NON hanno habitat intestinale!!

Caratteristiche principali della famiglia sono:

- morfologia: bastoncelli di dimensioni standard (0,5-1,5 µm diametro, 2-4 µm lunghezza)
- gram – : si colora di rosso
- NON sporigeni (era scontato perché solo i gram+ sono sporigeni)
- metabolismo energetico: aerobi facoltativi (se c'è O_2 respira, sennò fermenta o resp. anaerobica)
- fermentano il glucosio con produzione di acidi e gas

  Questo è importante quando si devono ricercare questi micro, quando si fanno le analisi per trovarli
- riducono i nitrati a nitriti (usando i nitrati come accettori di e^-)
- ossidasi – e catalasi +

  Sono due test di laboratorio: catalasi + indica che liberano O_2 a contatto con H_2O_2 (e quindi che sono abituati a vivere in contatto con O_2 e ad utilizzarlo), ossidasi – indica l'assenza del citocromo ossidasi, trasportatore specifico individuato nel test con una variazione colorimetrica).
- capacità di movimento: sono prevalentemente mobili per la presenza di flagelli peritrichi (= su tutta la loro superficie). Questa caratteristica viene in molti casi persa.

Questa famiglia raccoglie più di 50 generi e quelli più importanti sono:

(1) SALMONELLA

Genere tra i più importanti nel settore alimentare, n^{H} storicamente perché è tuttoggi molto studiato e ha un'elevata incidenza. Il suo nome deriva dal veterinario Salmon che la studiò nel 1900.

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM -
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	PREVALENTEMENTE MOBILI

> classificazione

Molto complessa ed in continua evoluzione. Nella classificazione precedente si distinguevano molte specie mentre in quella attuale si hanno solamente due specie:

- bongori
- enterica: suddivisa in 6 sottospecie (nella classificazione vecchia erano tutte specie)
  - arizonae
  - diarizonae
  - houtenae
  - indica
  - salamae
  - enterica: è la specie che dà più problemi dal punto di vista alimentare. Raggruppa, infatti, diversi ceppi patogeni e questi sono classificati in base alla risposta immunogenica, in base alla relazione antigene-anticorpo. Vi sono tre tipologie di antigeni:
    - O: o antigeni somatici o di superficie. Sono i lipopolisaccaridi presenti sulla membrana esterna dei gram-. È la parte polisaccaridica che funge da antigene (la parte lipidica è tossica) ed essa presenta una parte costante ed una variabile da ceppo a ceppo (questa permette la relazione con anticorpi diversi).
    - H: o antigeni flagellari. Sono legati alla struttura delle proteine che compongono il flagello quindi presenti solo in micro flagellati
    - K: o antigeni capsulari o di virulenza. Sono presenti nella capsula

sono i principali antigeni e sono distinti mettendo un numero dopo la lettera

Nella pratica: si mette a contatto un organismo con del siero = qualcosa che induce la produzione di antisiero (=anticorpi) specifico per quell'antigene. Si attua poi una reazione di agglutinazione o di precipitazione con quell'antisiero per saggiare uno specifico antigene: se l'agglutinazione avviene significa che il micro possiede quell'antigene.

Un micro che risponde ad un determinato siero diventa un sierotipo o sierovar, e quindi dopo aver stabilito la sottospecie si deve identificare il sierotipo del micro (obbligatorio!!).

I sierovar della Salmonella sono indicati con formule complesse in cui si considera sia la relazione con gli antigeni O che la relazione con gli antigeni H.

Il nome completo di una Salmonella prevede allora:

genere + specie + sottospecie + sierotipo

Per semplificare si sono identificati i sierotipi più importanti con un nome e poiché questi appartengono tutti alla specie enterica sottospecie enterica si sono omessi questi termini e si va ad indicare solamente il genere e il nome del sierotipo.

Es: Salmonella enterica subsp. enterica serotype (ser.) Typhimurium

semplificato: Salmonella serotype (ser.) Typhimurium o Salmonella Typhimurium

scritto non in corsivo e con la lettera maiuscola per evitare di confonderlo con il nome della specie!!!!

N.B. le Salmonelle sono causa di gastroenteriti lievi ad eccezione di:
- Salmonella typhi
- Salmonella paratyphi

che causano il TIFO, patologia molto più seria. Per questo è stato loro concesso di mantenere la denominazione di specie, anche se per l'attuale classificazione sarebbero sierovar della Salmonella enterica subsp. enterica, così da evitare confusione.

N.B. Solitamente si usa il solo termine "Salmonella" così da evitare la complessa nomenclatura. Possiamo fare ciò anche perché sappiamo che l'elevato numero di ceppi patogeni appartiene alla specie enterica subsp. enterica quindi sottointendo.

> ecologia

Il micro vive nell'ambiente e i parametri ambientali a cui vive sono:

- T: è mesofilo quindi non ~~vive~~ si sviluppa a T di refrigerazione (apparte alcune eccezioni di ceppi che sono psicrotrofi) e sopravvive a T massime di 45-47 °C. È molto facile ucciderli con il calore e infatti D_{65} = meno di 0,1 - 0,2 min.
- pH: non si sviluppa al di sotto di 4,5 e pH ottimale è tra 6,5 e 7,5
- Aw: sensibili alla carenza d'H_2O quindi necessitano di almeno Aw = 0,93 per svilupparsi
- sono indifferenti alla presenza o meno di O_2
- molto sensibili alle radiazioni UV (come tutte Enterob.)

> caratteristiche particolari

- poco sensibile ai nitriti
- NON fermenta il lattosio (caratteristica che permette di distinguere due gruppi di Enterob.)
- non è un buon competitore dove ci sono altri micro, quindi si riproduce poco e cresce lento
- si conserva benissimo nell'ambiente anche se non è sporigena, rimane viva ma non vitale

> fonti di contaminazione

Il serbatoio (reservoir) è l'intestino e n^{tt} quello di animali. Predilige n^{tt} l'intestino degli avicoli, dove vive in modo asintomatico = non crea problemi agli animali, alla loro salute, e la quantità di micro nell'intestino dipende anche da come sono allevati gli avicoli.

> alimenti a rischio

- pollame crudo e prodotti a base di pollo (il rischio aumenta quando si consuma l'alimento crudo, perché la cottura corretta elimina i micro, e aumenta tanto più il prodotto è manipolato perché così può essere contaminato da più fattori).
- uova: sia fuori (x contaminazione fecale) che dentro (perché spesso il micro colpisce le ovaie).
- carne cruda e prodotti di carne (se più manipolati più rischio).
- pesci crudi e molluschi filtratori: sono contaminati se l'acqua in cui vivono è stata a sua volta contaminata dalle feci ricche di Salmonella.
- frutta e verdura fresca: se l'irrigazione è fatta con acqua contaminata o se si utilizza una concimazione organica.
- spezie: sono fonte di inoculo per fare arrivare piccole quantità di micro sugli alimenti dove possono poi svilupparsi. Le spezie presentano elevate quantità di micro poiché sono prodotte in luoghi dove si hanno T elevate (ciò favorisce lo sviluppo dei micro) e dove i controlli igienico-sanitari sono scarsi.

cottura corretta: cottura in cui il calore deve penetrare fino al centro del prodotto, deve arrivare fino al cuore così da colpire anche i micro presenti all'interno. La cottura è infatti la modalità principale con cui si eliminano le Salmonelle presenti perciò è meno lasciare un prodotto al sangue.

> patologia

Quando si parla di "Salmonelle" si intende i ceppi che causano la Salmonellosi, patologia gastroenterica. La loro dose infettante (= quantità di cellule da ingerire perché si contragga la patologia) è elevata: $10^6 - 10^8$ cellule.

Questo valore non è però stabile ma può essere modificato da diversi aspetti, come lo stato di salute dell'individuo ma n^{tt} in base alla composizione chimica dell'alimento in cui il micro è presente. Se, infatti, l'alimento ha un elevato contenuto di lipidi e proteine, queste sostanze vanno a proteggere il micro da enzimi che può incontrare.

Altro aspetto importante è lo stato fisico dell'alimento: se infatti è solido va a proteggere ulteriormente i micro poiché le parti solide sono degradate prima delle Salmonelle. Anche se l'alimento risulta liquido e viene ingerito a stomaco vuoto si va a favorire i micro poiché il transito intestinale è molto rapido e gli enzimi non fanno in tempo ad agire. Poiché la dose infettante è elevata per raggiungere questi valori è necessaria una riproduzione del micro nell'alimento e questo avviene quando viene interrotta la catena del freddo.

La S. presenta nella sua struttura delle endotossine, che vengono liberate quando il micro muore e queste risultano tossiche per l'uomo, ma è anche in grado di produrre diverse esotossine che contribuiscono a scatenare la patologia.

S. deve arrivare viva e vitale nell'intestino e quando arriva riconosce i recettori di membrana ed inizia a lavorare. La sua attività non è invasiva, non penetra all'interno, al massimo degrada i primi strati dell'epitelio ed è una situazione limite quando penetra e finisce nel sangue dando setticemia (avviene solo per persone appartenenti a delle categorie a rischio).

La Salmonellosi è una tossinfezione che comporta un disturbo dell'apparato gastro-intestinale e che può anche innalzare T con:

- modo diretto: con l'azione di endotossine che sono pirogeni esogeni
- modo indiretto: è il nostro organismo che alza T per velocizzare la risposta immunitaria

Presenta tempi di incubazione (= tempo che intercorre tra l'ingerimento del micro e lo sviluppo dei sintomi) mediamente lunghi, qualche giorno con minimo di 8-10h.

La gastroenterite comporta uno squilibrio nell'intestino dovuto ad:

- la mucosa intestinale viene lacerata, si creano delle pieghe in quanto le cellule vengono danneggiate dal micro (poiché vi sono ulcere si può avere sangue nelle feci)
- l'equilibrio idro-salino viene alterato/ perciò il contenuto intestinale richiama acqua dagli organi (e non il contrario come solito) e ciò comporta diarrea.

Il livello di gravità è variabile e per questo molti casi non sono riportati, poiché lievi. La letalità è molto bassa (0,2-0,3%) e limitata a soggetti a rischio, ma il n° di casi di Salmonellosi negli ultimi anni è aumentato, in quanto:

+ migliorate le tecniche di rilevazione
+ nuovi meccanismi di tracciabilità e rintracciabilità per gli alimenti
+ il consumatore predilige alimenti poco trattati, n.te termicamente, e quindi questi prodotti possono avere maggior carica microbica.

I casi di Salmonellosi sono sempre stati elevati negli anni, la S. è infatti il micro più diffuso come rilevazione, ma negli ultimi anni sono aumentati i casi di Campylobacter (poiché solo di recente si è trovata la tecnica per rilevarlo) quindi quasi sorpasso.
La cura è sintomatica (= si curano i sintomi) e spesso si ha una remissione spontanea, quindi è limitato l'uso di antibiotici. Le S. sono sensibili agli antibiotici in quanto sono batteri ma vi sono alcuni ceppi che sono diventati antibiotico-resistenti proprio grazie ad uno nostro abuso di questi farmaci

per far nascere una resistenza bisogna esercitare una pressione selettiva = utilizzo di antibiotici dove vi sono molte S.
Ciò è stato fatto nt negli allevamenti di avicoli: i polli non si ammalano con S. ma danno una resa minore. Si va allora a limitare lo sviluppo dei micro somministrando dosi sub-terapeutiche di antibiotici e questo crea un pressione selettiva per i micro, che quindi si riproducono meno velocemente. Se nell'allevamento arriva un micro resistente a quell'antibiotico esso non sarà soggetto alla pressione selettiva come gli altri quindi sarà più favorito nello sviluppo, avrà velocità di riproduzione maggiore e col tempo si avranno solo S. resistenti all'antibiotico. Questa prima S. resistente può svilupparsi a seguito di una mutazione oppure può aver ricevuto i geni che danno la resistenza a seguito di un trasferimento di DNA. Negli allevamenti i micro risultano resistenti a diversi antibiotici poiché quando S. diventano immuni per uno, se ne somministra un altro e così via.
N.B. Il problema è serio quando S. entra a contatto con altri micro e scambia geni per antibiotico-resistenza!!!! nt se patogeni gravi!!
Nel 1986 negli USA 50% produzione antibiotici destinata allevamenti!! e di questi 90% usati come dosi subterapeutiche.

> analisi microbiologiche

Le analisi attuabili per cercare S. sono diverse (tradizionali, genetiche, immunoenzimatiche) ma quelle più diffuse e richieste sono le analisi microbiologiche classiche = ricerca di micro vivi e vitali che possono essere attuate in mezzo liquido o in mezzo solido. Le diverse fasi sono:

- si prende l'alimento e si attua un campionamento
- attuo un mezzo selettivo = ambiente in cui può svilupparsi solamente la Salmonella, in cui sono state selezionate sostanze che permettono il solo sviluppo di S. Prima di attuare ciò devo verificare che S. sia in condizioni ottimali (perché le do solo quello che non sa sintetizzarsi, per il resto deve arrangiarsi) quindi attuo un pre-arricchimento = trattamento con H_2O peptonata a 37°C x 18-24h. Con ciò S. torna a condizioni ottimali e quindi la metto in mezzo selettivo = processo di arricchimento selettivo. Dovrei misurare le S. nell'alimento ma in questo mezzo se ne sviluppano di più. Posso comunque fare ciò per S. perché devo attuare una analisi qualitativa (se c'è o no) in quanto per legge si deve avere assenza in 25 gr di prodotto. Quindi non mi interessa quante ce ne sono ma se si sviluppano vuol dire che almeno una ce n'era.
- se ci sono S. devo attuare una identificazione sierologica = a che sierotipo appartiene

↗ sempre S. enterica subsp. enterica

Vi sono due sierovar, S. typhi e S. paratyphi, che nn danno gastroenteriti ma sono tifoidee

sono agenti eziologici del tifo, malattia di origine batterica che comporta un forte innalzamento della T e per questo è anche detta "febbre tifoidea". Questa patologia comporta debolezza e confusione mentale (infatti tiphos = confusione). L'unico ospite è l'UOMO!! L'alimento è solo un veicolo per i micro e la dose infettante è bassa (10^2-10^3), quindi basta un solo contatto con il portatore (che non ha una buona igiene) per contaminare. Questa patologia è una infezione: quando il micro oltrepassa la mucosa intestinale, entra nel sistema linfatico e sanguigno dove viene fagocitata dai globuli bianchi. Questo micro riesce però ad impadronirsi dei macrofagi, vi si moltiplica all'interno e poi va ad infettare gli organi. La setticemia è in questo caso molto comune. L'incubazione è lunga, 20-30 gg, perché il micro deve riconoscere i recettori della mucosa intestinale, deve crearsi un varco al suo interno e una volta entrato nel sangue deve vincere la resistenza dell'organismo. L'unica terapia è quella antibiotica e si tratta di una malattia ad ampia diffusione (endemica nei paesi in via di sviluppo). Vi è un caso storico degli inizi del 900: la "Mary tifoidea" era una signora che presentava queste S. nella cistifellea ma per lei non erano patogene. Per la sua scarsa igiene comportò 7 casi di tifo in 7 famiglie dove lavorava come cuoca.

Fig. 11 - Vie di contaminazione e formazione di endotossine delle salmonelle che causano enteriti.

Fig. 13 - Vie di contagio con *Salmonella typhi*.

Differenze tra	S. GASTROENTERICHE	S. TIFOIDI
AGENTE EZIOLOGICO	Oltre 2000 diversi sierotipi	Solo 2 sierotipi: S. typhi e S. paratyphi
MALATTIA	Tossinfezione (Salmonellosi)	Infezione generalizzata
PORTATORE	L'habitat è l'intestino degli animali stt quello degli avicoli	L'ospite è l'uomo che è affetto da questa patologia oppure vi son casi in cui la S. si stabilisce nella cistifellea (raccoglie i sali biliari) senza dare i sintomi (es : Mary tifoidea)
TRASMISSIONE	Con l'alimento che è il substrato dv si riproducono i micro	O x contatto diretto con un portatore o x consumo di alimenti che son stati contaminati (gli alimenti son più un veicolo che un mezzo per la riproduzione dei micro)
TEMPO DI INCUBAZIONE	Da ore fino a 1-2 gg	1-2 settimane
DOSE INFETTANTE	Solitamente alta	Bassa (centinaia di cellule)
DURATA MALATTIA	Solitamente pochi gg	2-4 settimane
TERAPIA	Sintomatica	Antibiotica, necessaria in quanto la setticemia è molto frequente
DIAGNOSI	Ricerca dei micro nelle feci e negli alimenti e anamnesi = storia clinica del paziente	Ricerca dei micro nel sangue, nelle feci e nelle urine
IMMUNITA' ACQUISITA = se contraggo quella malattia e la supero, il mio organismo si ricorda di averla contratta e in caso di ulteriore contatto può evitare la patologia	Non possibile in quanto vi è un numero elevato di diversi sierotipi quindi se ne incontrano sempre di diversi. Gli antigeni son allora diversi e i nostri anticorpi non li riconoscono	Possibile in quanto vi sono solamente due sierotipi diversi
PROFILASSI = azioni attuate x prevenire il problemi	Igiene alimentare = ridurre la possibilità di contaminazione e di riproduzione dei micro negli alimenti	Igiene alimentare, stt igiene di colui che manipola gli alimenti poiché è lui che può fungere da portatore. È possibile una vaccinazione

② SHIGELLA

Il suo nome deriva da un suo studioso Shiga e l'unica specie legata alla patologia di interesse alimentare è la Shigella dysenteriae

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM -
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	IMMOBILI (PRIVE DI FLAGELLI)

> classificazione

Questo genere raggruppa poche specie, che sono:

- dysenteriae
- flexneri
- boydii
- sonnei

e queste quattro specie presentano diversi sierotipi con antigeni somatici = tipologia O

> caratteristiche particolari

È simile a E. coli (specie di riferimento per le Enterobacteriaceae) tranne per alcuni aspetti:

- non è in grado di utilizzare il lattosio
- non producono gas da glucosio

> fonti di contaminazione

L'unico ospite di questi micro è l'uomo. Di conseguenza la loro diffusione è legata alle condizioni igieniche dell'individuo e al corretto smaltimento dei rifiuti (n# le feci).
La normativa NON prevede la ricerca di questo micro negli alimenti, non sono stati imposti dei limiti, in quanto non si sono mai rilevati a livelli tali da dare dei problemi all'interno degli alimenti. La contaminazione avviene infatti solamente nella fase finale di consumo del prodotto e quindi non ha senso ricercare questi micro prima.
Una persona infetta elimina molti micro attraverso le feci (10^7-10^9 cfu/g feci), cosa comune agli altri micro, ma può eliminare quantitativi minori anche quando i sintomi sono passati o prima che si manifestino!! Questo è un problema poiché la disseminazione è occulta

> alimenti a rischio

Gli alimenti interessati da questi micro sono n^{tt} quelli manipolati dall'uomo. In particolare le insalatone (dove c'è insalata, tonno, gamberetti, formaggio...), i cui ingredienti vengono manipolati prima di essere inseriti.

> patologia

le S. dysenteriae sono patogeni alimentari e comportano una patologia gastrointestinale più severa rispetto alla Salmonellosi, di gravità mediamente superiore. Questa patologia è detta dissenteria bacillare o shigellosi e prevede oltre a gastroenteriti anche diarea sanguinolente (perché questo micro è più aggressivo, attacca la mucosa intestinale [ma NON è invasivo]).
Questa patologia tende a colpire grandi gruppi di persone, comporta n^{tt} casi multipli e questo è favorito dal fatto che la dose infettante è molto bassa: 10-100/200 cell.
È una tossinfezione con incubazione di qualche giorno e guarigione completa in 1-2 settimane. Non è frequente nei paesi industrializzati ma è molto grave nei paesi in via di sviluppo, anche perché questo micro, essendo mesofilo, vive meglio in climi più caldi. Si identificano isolandoli dalle feci (più facile che siano sull'uomo che sull'alimento) con test biochimici, immunologici o genetici. È un micro poco immunogenico = comporta la produzione di pochi anticorpi quindi non è necessario ricavare un vaccino, e può assumere l'immunità agli antibiotici.
Quando il micro arriva nell'intestino riconosce le cellule della mucosa e vi penetra all'interno. Viene racchiuso all'interno di una membrana e lì si moltiplica e una volta fatto ciò rompe la membrana e va a colonizzare la cellula. I micro possono passare alle cellule vicine e muoversi all'interno della cellula utilizzando le proteine di actina: riconoscono queste proteine e le accatastano così da permettere uno spostamento. La Shigella con questa azione uccide alcune cellule della mucosa intestinale, portando ad escoriazioni interne che comportano sangue nelle feci, ma non riesce quasi mai a penetrare fino ai vasi sanguigni in quanto viene bloccata dal nostro sistema immunitario.
Tutti i ceppi producono delle enterotossine, che probabilmente comportano la diarrea, ma solamente la S. dysenteriae produce la tossina SHIGA = esotossina che è enterotossica e citotossica (= uccide le cellule in cui il micro entra bloccando la sintesi proteica per inattivazione dei ribosomi). Tossine di tipo SHIGA sono prodotte anche da Vibrio e E. coli e la loro azione comporta colite emorragica e sindrome emolitico-uremica (crea danni ai reni).

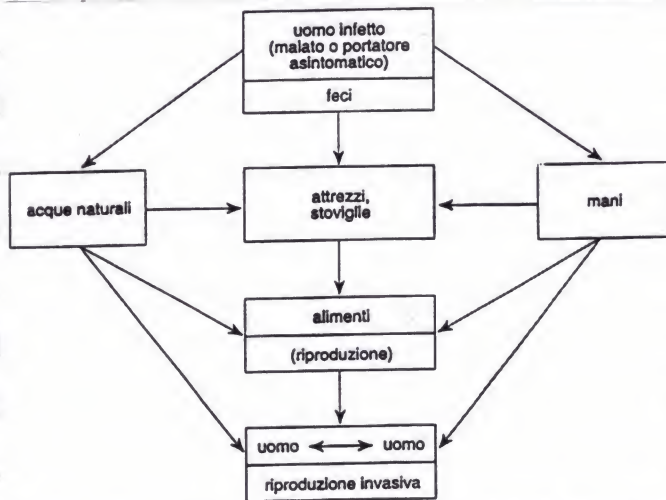
la produzione di tossine è attivata dalla T : quando il micro arriva in un ambiente a 37°C inizia a produrre le tossine, poichè è arrivato in un luogo ideale per il suo sviluppo, mentre quando la T è più bassa le tossine non sono prodotte così da risparmiare energia.

La Shigellosi nel mondo è endemica e all'anno vi sono 164,7 milioni di casi, di cui 163,2 milioni nei paesi in via di sviluppo. Ogni anno 1,1 milioni di persone muoiono di Shigellosi e la percentuale di persone maggiormente colpite presentano meno di 10 anni di età.

Fig: vie di contaminazione della shigella

3 ESCHERICHIA COLI

Il nome deriva da un suo studioso Esherich (si legge esceric) mentre coli deriva da colon, ambiente dov'è stato isolato per la prima volta.

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM -
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	MOBILE (PER FLAGELLI PERITRICHI)

> caratteristiche particolari

È in grado di fermentare il lattosio (a differenza di Salmonella, Shigella e Yersinia)

> fonti di contaminazione

Sono ospite normale e abbondante dell'intestino animale e umano, la maggior parte di essi fa infatti parte della nostra flora intestinale e proprio perchè sono abbondanti nella flora sono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale. E. coli è allora un micro buono e positivo per la nostra flora, ma alcuni ceppi sono diventati patogeni in quanto sono venuti a contatto con altri patogeni e con essi hanno attuato degli scambi orizzontali di geni ottenendo il gene che ne determina la patogenicità.

> classificazione

I ceppi che hanno un carattere patogeno sono riuniti in gruppi in base al tipo di patologia che scatenano (è sempre un problema gastrointestinale ma questo può essere più o meno intenso). Anche per questo micro si distinguono sierotipi O, H e K e quelli più abbondanti sono O e H.

Si distinguono diverse categorie in base all'azione, alla patologia che scatenano e le 4 categorie più importanti risultano:

A EIEC E. coli enteroinvasivi

Hanno un comportamento simile a quello delle Shigelle e infatti invadono la mucosa intestinale e degradano il primo strato di epitelio creando delle lacerazioni.

> caratteristiche particolari: non producono enterotossine, non si muovono in quanto non hanno flagelli, non fermentano il lattosio e non producono gas dalla fermentazione degli zuccheri

la loro virulenza è dovuta a geni localizzati sui plasmidi e la dose infettante è bassa

> serbatoio: uomo

> alimenti a rischio: carne macinata e latte crudo

N.B. Anche se sono molto simili alle Shigelle non sono classificati come tali in quanto la classificazione è attuata oggi in base alla subunità 16 S del ribosoma e questa è quella tipica di E.coli

(a sequenza nucleotidica del rRNA 16S, che è trasmessa da madre a figlio quindi rimane invariata.)

B ETEC E. coli entero-tossigeni

Producono due (entero)tossine di tipo colera-simili e sono:

- LT: tossina termolabile, quella più simile alla tossina colerica, è una proteina codificata nei cromosomi
- ST: tossina termostabile, è una proteina codificata sui plasmidi. Resiste a trattamenti con proteasi e con acidi

Poiché producono tossine sono poco invasivi e hanno una dose infettante alta.

Sono uno dei principali agenti della "diarrea del viaggiatore" o "sindrome di Montezuma" = problemi gastrointestinali che si hanno quando si va in paesi con condizioni igienico-sanitarie precarie.

C EPEC E. coli entero-patogeni

Non sono invasivi né producono tossine ma vanno a colonizzare le cellule dell'intestino tenue distruggendo i microvilli senza penetrare nelle cellule. Si hanno quindi problemi di assorbimento che comportano diarree n^{H} nei bambini, la dose infettante è bassa.

> serbatoio: uomo

> alimenti a rischio: carne, pollame

D **EHEC** E. coli entero-emorragici

Sono stati identificati recentemente (1982) e sono caratterizzati dalla presenza di una esotossina di tipo Shiga e per questo sono indicati anche come **STEC** = E. coli Shiga Toxin. Questa tossina è specifica, enterotossica e citotossica ed è anche detta verotossina (questi micro allora indicati anche come **VTEC**), in quanto è risultata tossica per alcune cellule di una scimmia appartenente a genere "vero". Codificata nel genoma di alcuni batteriofagi che possono trasmettere questi geni quando attuano il ciclo lisogeno: quando infettano una cellula inseriscono il loro DNA nella cellula e poi questo si integra con il DNA cellulare. Quando riprendono il ciclo litico, cioè iniziano a riprodursi, il DNA del batterio si stacca e può farlo in modo anomalo lasciando nel DNA cellulare dei geni batterici. E. coli sono in grado di produrre questa tossina Shiga proprio perché i geni batterici rimasti erano quelli che codificavano per quella tossina.

pg 132 → libro micro figura in fondo x ciclo litico e lisogeno

> serbatoio: intestino uomo infetto e n^{te} animali, tra cui di più nei bovini

> patologia: più grave di quelle degli altri E. coli ed è detta sindrome emolitico uremica (SEU o HUS): queste tossine uccidono n^{te} i globuli rossi e fanno ciò a livello delle arterie renali, occludendole e bloccando il lavoro dei reni. È quindi una patologia molto grave, ~1/3 dei colpiti necessita di ricovero e nei casi più seri servono trasfusioni per apportare globuli rossi o dialisi per far fronte al non funzionamento dei reni.

In questa categoria il più pericoloso è il sierotipo O157:H7 (O = antigene somatico, H = antigene flagellare). È uno dei patogeni alimentari più pericolosi e ha caratteristiche atipiche per il suo genere, n^{te} per quanto riguarda l'ecologia:

- è acido resistente quindi in grado di sopravvivere anche a pH < 4,5
- non si sviluppa a T ≥ 44,5 °C, T utilizzata per verificare la presenza di E. coli nei prodotti poiché a qst T sono le uniche enterob. in grado di sopravvivere.
- non ha attività β-glucuronidasica, tipica di E. coli e per questo utilizzata come test per identificarle nei prodotti.
- non fermenta sorbitolo e ciò è utilizzato per verificare la sua presenza
- fermenta male il lattosio

Il suo habitat principale è l'intestino dei ruminanti e per questo può essere presente per contaminazione fecale nel latte (poco frequente) o nella carne macinata (bovina n^{te}) (si parla infatti di malattia degli hamburger, hamburger disease, perché è molto frequente la contaminazione di questi prodotti).
Dose infettante bassa: 10 - 100 cellule. Altri alimenti che possono essere contaminati sono le verdure (contaminate con concimazioni organiche), il sidro (succo di mele fermentato che può essere diluito con H_2O contaminata), melone (poiché ha pH = 5), H_2O, H_2O di balneazione...
Questa patologia è sempre rilevata perché comporta sintomi abbastanza gravi e che devono essere curati. Si sviluppa n^{te} nei mesi estivi

(4) YERSINIA ENTEROCOLITICA

Il suo nome deriva dallo studioso Alexander Yersin. Questo genere non è tra i più pericolosi dal punto di vista alimentare ma è parente della Yersinia pestis, agente eziologico della peste. Queste due specie sono comunque diverse: Y. enterocolitica ha habitat intestinale, Y. pestis si trasmette con i topi e le pulci (nel 1300 in Europa ha ucciso 1/3 popolazione).

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM -
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	IMMOBILE

> classificazione

Si distinguono 5 diverse biovar (= micro isolati in una certa area geografica) correlati a sierotipi O e quella più diffusa e legata alle patologie e la biovar 4 sierovar O:3.

> ecologia

Y. predilige ambienti con T inferiori a quelli delle altre enterob., è quindi più psicrotrofa che mesofila come le altre enterob. Per questo non si sviluppa nel nostro intestino, perchè la T di 37°C è troppo elevata e va a rallentare la crescita del micro che a qst T perde anche la capacità di muoversi, e resiste bene alle T di congelamento. La sua T ottimale è allora tra 25 e 30°C.

> fonti di contaminazione

La Y. enterocolitica non fa parte della flora intestinale dell'uomo, non vive nel nostro intestino ma vive in quello di molti animali, n^{tt} nei suini.

> alimenti a rischio

Sicuramente prodotti carnei, più facile la carne suina, ma anche il latte e i derivati possono essere soggetti a contaminazione fecale. Proprio perchè è ad abitat intestinale è presente nell'ambiente (può contaminare verdure) e nell'acqua e può anche colpire cani e gatti. Sono un problema n^{te} per i cibi refrigerati perchè predilige T basse.

> patologia

Da problemi gastro-intestinali dovuti a endotossine (produce anche una esotossina ma la fa a 30°C non a 37°C), colpisce n^{tt} i bambini e da diaree con dolori simili a quelli dell'appendicite.

Si tratta di una tossinfezione ma sono possibili processi invasivi a carico dell'epitelio intestinale da parte del micro. La dose infettante non è ben nota ma è stimata a valori elevati di 10^4 cellule. Non è una patologia frequente e si presenta n* nei mesi autunnali - invernali proprio perché questo micro predilige T più basse.
Vi sono dei casi in cui l'antigene ha una forma pressoché uguale a quella di alcune molecole proprie del nostro organismo. L'anticorpo allora, prodotto proprio per ostacolare quell'antigene, andrà a degradare anche le molecole che presentano la stessa forma in quanto è convinto che siano anch'esse antigeni. Questa è la metodologia di una malattia autoimmune e si presenta anche a seguito di contatto con Y. enterolitica, che può comportare erythema nodosum: arrossamento e formazione di noduli dovuti all'azione degli anticorpi costruiti contro la tossina del micro.
Si dimostra con ciò che una patologia alimentare può avere anche effetti a medio-lungo termine, non dovuti minimamente all'azione del micro o alla malattia alimentare che esso ha generato, ma dovuta a reazioni successive.

5. CITROBACTER
6. ERWINIA
7. KLEBSIELLA

vivono nell'ambiente e hanno rapporti con ospiti diversi dall'uomo (es: erwinia presenta alcune specie che sono patogeni per le piante).

8. PROTEUS

O micro opportunisti in quanto vivono in qualsiasi ambiente. Non sono però competitivi quindi non prevalgono sugli altri micro ma non appena questi micro si indeboliscono i micro del genere proteus li sovrastano.

N.B. Proprio perché queste 4 generi di enterob. non vivono nell'intestino **NON** si può affermare che ci sia stata una contaminazione fecale quando nel prodotto si riscontrano enterob. !!!!

famiglia **VIBRIONACEE**

Il nome deriva dalla loro forma incurvata, molto simile a quella di una virgola, e il genere più importante è il **VIBRIO** o vibrioni

↓

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	VIRGOLA
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM-
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	MOBILI (SOLITAMENTE X UNICO FLAGELLO POLARE)

> caratteristiche particolari

Sono catalasi positivi e ossidasi positivi e quest'ultima è la caratteristica che li distingue da entero

> ecologia

Questi micro sono mesofili, hanno T ottimale di 37°C, quindi vivono bene nel nostro intestino e dove vi sono climi caldi. Non si sviluppano a T di refrigerazione (quindi è importante mantenere la catena del freddo per quelli alimenti che sono a rischio) ma si sviluppano rapidamente se la refrigerazione si interrompe. Sono sensibili al calore quindi la cottura li elimina.
Tra i batteri sono quelli con pH ottimale più elevato, ~ 8-9 non 7 come per altri micro, ma comunque non vi sono alimenti con questi livelli di pH (eccezione sono i gamberetti e affini che hanno pH leggermente superiore a 7 quindi possono essere più colpiti da qst micro).
Vivono con una concentrazione salina ottimale del 3% (= concentrazione sale nell'H_2O marina) e se questa è minore la loro crescita si blocca (eccezione è V. cholerae che si accresce anche a concentrazioni saline minori). Sono sensibili a Aw basse (<0,90) e a pH acidi (<4,5).

> fonti di contaminazione

È il genere dominante negli ambienti con acqua salata e salmastra = habitat marino

> alimenti a rischio

Proprio perché hanno habitat marino si trovano nei pesci, nei molluschi e nei crostacei, la loro presenza è normale, non indicano una contaminazione fecale delle acque (come è se invece trovo E.coli) proprio perché questi micro vivono lì, è il loro ambiente naturale.
I problemi più grossi si hanno con gli organismi filtratori, come i molluschi bivalvi, in quanto i vibrio aderiscono fortemente all'intestino del mollusco, instaurano un rapporto più stabile e quindi non vengono eliminati con la sola depurazione in acqua pulita, come avviene invece per Salmonelle o E.coli in quanto questi si accumulano solo nel mollusco, non creano un rapporto con esso.

> classificazione

le specie più importanti che sono patogene per l'uomo sono 3 e sono:

A VIBRIO CHOLERAE

Importante sia storicamente che per la sua diffusione in quanto è l'agente eziologico del colera ed è un micro epidemico, endemico (=costantemente presente) e pandemico (=presente in tutto il mondo). Ha causato 7 pandemie da quando è stato scoperto.
Inizialmente si distingueva un'unica biovar, detta classica (scoperta da Koch, famoso anche per i suoi 4 postulati che permettono di determinare se un fenomeno è di origine microbica o no), mentre agli inizi del '900 venne isolata nella località El Tor, vicino alla Mecca, una nuova biovar con caratteristiche fisiologiche diverse e che sembra responsabile dell'ultima pandemia.
Questa specie è divisa in più di 140 sierotipi, che si differenziano per l'antigene O, e quasi tutti i casi di colera sono collegati al sierotipo O_1. Questi sierotipi possono poi presentare diverse tipologie di antigeni: A (sempre presente nei ceppi legati alla sindrome colerica) B e C.

anche il V. cholerae O139 (isolato in India nel '92) risulta patogeno. Questo è un vibrio con tutte le caratteristiche della biovar El Tor ma esso non risponde agli antibiotici in quanto ha probabilmente avuto una mutazione che ha modificato gli LPS di superficie, non più riconosciuti dagli antibiotici.
Tutti gli altri vibrio, ad eccezione dei sierotipi O_1 e O139, non scatenano la patologia colerica, per questo sono detti "non O1" e "non O139".

Caratteristiche che deve avere un ceppo per essere patogeno sono:
- appartenenza al sierogruppo O1 o O139;
- produzione della enterotossina colerica;
- produzione del pilo per la colonizzazione dell'intestino.

(caratteristica che il micro può perdere a seguito di mutazioni)

Vanno a colonizzare le acque salmastre e molti ceppi possiedono l'enzima chitinasi in grado di degradare la chitina, polisaccaride di gli conio molto abbondante nell'esoscheletro dei crostacei e dei molluschi bivalvi. Questo enzima permette ai micro di ricavarsi delle nicchie negli esoscheletri, così da rimanere protetti, e permette anche ai micro di ricavare molta energia dalla degradazione della chitina. Può entrare nello stato VBNC = vitale ma non coltivabile ⇒ non si riproduce in laboratorio e ciò dà problemi di rilevazione.

la patologia è una tossinfezione e il vibrio NON è invasivo, cioè colonizza l'intestino tenue ma non penetra mai la mucosa intestinale, non arriva mai al sangue (quindi l'emocoltura, coltura dei micro usando come terreno il sangue, è sempre negativa).

Quando il micro ha instaurato i rapporti con l'intestino inizia a produrre la tossina colerica,

→ esotossina specifica prodotta in loco. È costituita da più subunità quindi vi sono più geni che codificano per diverse proteine che poi devono assemblarsi a costituire la tossina. Si distinguono 2 subunità: — figura pg dopo

- subunità tossica (A1)
- subunità legante: funzione di trasporto, di riconoscere il luogo d'attacco e di attuarlo

Queste sono unite da un ponte disolfuro che unisce ammino solforati (cisteina o metionina) la subunità legante riconosce i recettori specifici sulla mucosa intestinale e vi si attacca covalentemente creando un legame stabile. la parte tossica viene poi iniettata attraverso la membrana dentro la cellula intestinale. Questa tossina è specifica ed interagisce con la sintesi di AMP ciclico — figura pg dopo

↓

molecola che deriva da ATP grazie all'azione dell'enzima adenilato ciclasi che toglie due gruppi fosfato e utilizza il terzo per formare una struttura ciclica (richiudendolo sullo zucchero). È sempre prodotto dalle cellule ed è importante regolatore del metabolismo, n* regola l'equilibrio idrosalino. Quando agisce la tossina colerica, porta la cellula a produrre continuamente AMP-ciclico e ciò squilibra l'equilibrio salino. = viene bloccato l'assorbimento dello ione Na^+ e si aumenta l'esportazione dello ione Cl^-

Il lume intestinale si arricchisce allora di $Na^+ + Cl^-$ = sale e ciò richiama H_2O da intestino, dal flusso sanguigno verso il lume intestinale. Questo comporta perdita elevata di H_2O, fino a 5-10 l/gg, con diarree e a ciò consegue forte disidratazione e quindi accumulo di elettroliti che provoca palpitazioni, crampi

la principale fonte di diffusione sono le feci che contengono 10^7-10^8 cfu/gr e questo micro mira a riprodursi il più possibile nell'ospite per poi ucciderlo (lo uccide in quanto sicuramente si avrà contaminato qualcun altro e comunque sarà presente in elevatissima quantità nell'ambiente).

Nei paesi colonizzati il colera può arrivare da:

- alimenti importati che possono essere stati coltivati in acque salmastre;
- viaggiatori: persone che hanno consumato alimenti contaminate.

La dose infettante è mediamente alta, 10^5-10^6 cellule, ma poiché il n° di cellule **prodotte** dalle persone infette è molto elevato, fino a 10^{12}, il micro può essere molto abbondante nell'ambiente e per infettare qualcun altro basta che sia presente per 10^2-10^3 cellule/gr negli alimenti. Le fonti di contaminazione sono:

- acque contaminate da feci;
- alimenti venuti a contatto con acque contaminate.

Gli alimenti a rischio sono n^H pesci (se cotti no problem ma crudi sì!!), molluschi e crostacei (poiché come i pesci possono vivere in acque contaminate), riso (può essere coltivato in acque contaminate), succhi di frutta, ghiaccio, verdura e frutta lavate con acqua contaminata.
La terapia prevede il ripristino dei liquidi per via intravenosa, non per via orale perché l'H_2O può essere contaminata e perché va a finire nell'intestino dove ci sono già problemi.
È disponibile un vaccino ma non da garanzia assoluta e ha durata temporanea.

B VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Micro ad habitat esclusivamente marino e per questo necessita per svilupparsi di una salinità maggiore 3% (non è alotollerante come il V. cholerae). È diffuso n^H in Giappone ma è presente **anche nella laguna veneta** e poiché vi si allevano molluschi è necessario attuare dei test per verificare la presenza di questo micro.
Dà dei sintomi più vicini ad una modesta patologia gastro-intestinale che ai sintomi del colera e lo fa producendo una tossina emolitica. È quindi una tossinfezione e ha dose infettante elevata, 10^6-10^9, ma la patologia è lieve e raramente fatale.
È un mesofilo quindi si sviluppa meglio con T elevate (8-9' a 37°C) e il congelamento non lo uccide.

C VIBRIO VULNIFICUS

Micro diffuso nei paesi industrializzati, è molto pericoloso e può dare anche setticemia perché è altamente invasivo. I primi sintomi possono essere gastro-intestinali ma poi penetra la mucosa intestinale creando lesioni. Può penetrare anche per ferite, cosa non attuata dagli altri vibrio. La dose infettante è bassa e tanto più bassa negli individui a rischio e la letalità è molto elevata (40-60%). Produce una tossina citotossica e si sviluppa maggiormente se la T è più elevata. Può essere presente nei prodotti ittici e quindi è anch'esso ricercato nei molluschi allevati nella laguna veneta, ma non risulta presente.

genere **BACILLUS**

Il suo nome deriva dalla forma bastoncellare. È un genere molto diffuso, prevalentemente non patogeno e ubiquitario = trovo le specie ovunque. Le specie hanno ≠ caratteristiche e infatti si tratta di un genere molto eterogeneo: si può verificare ciò analizzando ≠ micro

- B. subtilis: vive nel terreno e non è patogeno
- B. thuringiensis: produce una tossina tossica per le larve di insetti, come per quelle della piralide lepidottero del mais che rovina la pianta a livello del colletto (dove si uniscono il fusto e le radici). Questo micro viene utilizzato per la lotta biologica e la sua tossina è utilizzata anche per la produzione di mais OGM: detto mais BT (dal nome del micro) e contiene un gene per la produzione di questa tossina.
- B. stearothermophilus: non è patogeno ma crea delle alterazioni negli alimenti. Producono spore molto termoresistenti che quindi possono permanere anche nei prodotti trattati termicamente e anzi le T elevate stimolano il loro sviluppo e se la confezione è gonfia è probabile il loro sviluppo.
- B. anthracis: potente patogeno che crea una seria patologia a livello polmonare producendo una tossina che può dare la morte. Comporta anche una lieve patologia alimentare che da solo problemi a livello gastro-intestinale.
- B. clausii: componente dell'enterogermina perciò è un batterio probiotico, che permette di rigenerare la flora microbica

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM +
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	SPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI (preferibilmente aerobi)
CAPACITA' DI MOVIMENTO	

> caratteristiche particolari

Catalasi positivo, ossidasi negativo e sono micro poco competitivi.

Noi andiamo a studiare l'unico bacillus patogeno alimentare: il **BACILLUS CEREUS**

A BACILLUS CEREUS

> caratteristiche generali

Vedi quelle del genere

> ecologia e caratteristiche particolari

Sono micro mesofili ma sono frequenti dei ceppi psicrotrofi. In generale comunque il tempo di duplicazione è minore con T più elevate. È un micro sporigeno e le sue spore si distinguono da quelle del Clostridium in quanto l'endospora nel micro è centrale, mentre nel C. è apicale o sub-apicale. Le spore sono difficili da colorare e per questo si usa n^H il verde malachite, colorante forte, e si applica a T elevate. Le spore sono termoresistenti ($D_{100} = 1,2-8'$) e la loro germinazione è indotta dal calore. Esse aderiscono bene alle superfici perciò sono difficili da rimuovere, anche perché sono idrofobiche. I micro sono catalasi positivi e ossidasi negativi.

> fonti di contaminazione

Le fonti principali sono il terreno e la polvere perciò gli alimenti vegetali sono più facilmente contaminabili.

> alimenti a rischio

Sono n^H quelli a contatto con il suolo come vegetali e n^H riso, perché è in parte coltivato in acqua e questa favorisce lo sviluppo e l'adesione dei micro. Sono a rischio i cibi precotti, cotti e lasciati raffreddare a T ambiente, in quanto le T elevate uccidono i micro viventi ma non le spore !! Alimento spesso precotto è il riso = doppio rischio. Altri prodotti a rischio sono latte e derivati (contaminato n^H in fasi di trasporto e di conservazione perché le spore aderiscono bene alle superfici), carne, spezie, prodotti essiccati (perché le spore resistono).

> patologia

È una tossinfezione con dose infettante elevata (10^5-10^7 cellule). Si distinguono due patologie molto diverse legate all'azione di questo micro:

- DIARROICA: tossinfezione dovuta ad una tossina termolabile quindi distrutta dai succhi gastrici, viene inattivata se preformata. Se invece il micro arriva nell'intestino e la produce la tossina si ha la patologia. L'azione è colera-simile, il tempo di incubazione è di qualche ora e la tossina non è resistente a pH < 5.
- EMETICA: dovuta ad una particolare esotossina, detta cereulide, che è molto termoresistente quindi se è presente nell'alimento dà patologia. Il tempo di incubazione è minore (xché la ingerisco già formata) e la tossina resiste fino a pH = 2.

I sintomi sono lievi e di breve durata perciò pochi casi sono riportati. Se si assumono piccole dosi del patogeno si può acquisire una immunità, una resistenza al micro. La patologia emetica è più acuta e in rari casi le patologie si possono presentare contemporaneamente.

specie **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

É un batterio a forma di cocco e il nome del genere deriva dalla modalità di aggregazione = forma aggregati tridimensionali irregolari (mentre streptococchi le fa regolari, fa catenelle). Il nome della specie legato invece al colore dorato che assumono le colonie in determinati terreni.

Le dimensioni medie sono di 1 μm e il genere non raggruppa solo patogeni alimentari, infatti:

- S. xylosus: micro tecnologico usato nella produzione dei salami e fa parte della microflora,
- S. epidermidis: da problemi all'uomo ma non di tipo alimentare.

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	COCCO
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM +
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	NON MOBILI

> ecologia

É un mesofilo e la T ottimale è 35-37°C, per questo il suo habitat è l'organismo umano, è un vero mesofilo perché è legato all'habitat in cui vive. É il batterio più resistente alla scarsità di H_2O disponibile (= Aw bassa) e infatti riesce a svilupparsi a valori inferiori a 0,90 (valore limite per lo sviluppo degli altri batteri). Cresce bene con elevate concentrazioni saline, 10% e alcuni ceppi anche al 20%, in quanto è in grado di produrre soluti compatibili (in questo caso ammino prolina). Si conserva bene anche nell'ambiente.

> caratteristiche particolari

É catalasi positivo e ossidasi negativo. Quest'ultima è una caratteristica importante che lo distingue dai micro del genere Micrococcus, ossidasi positivo in quanto sono aerobi stretti, che operano assieme ai micro del genere Staphylococcus nella fermentazione di carni, n# nei salami.

> fonti di contaminazione

É n# l'uomo, in quanto esso è l'habitat del micro. **NON** vive nell'intestino ma nel naso, gola, faccia, cuoio capelluto, brufoli. Più del 50% delle persone sane è portatrice!! Anche gli animali sono fonte di contaminazione (es: mastite in bovine) ma per loro è una situazione patologica.

> alimenti a rischio

É un tipico agente di contaminazione secondaria quindi gli alimenti interessati dipendono non dalla loro natura ma dai trattamenti-lavorazioni che hanno subito. Sono piatti preparati in anticipo e mantenuti riscaldati, carni, latte e formaggi, pesci e molluschi, alimenti con uova, piatti pronti.

> patologia

Il micro non è pericoloso ma lo sono le esotossine che produce.

↓

tossine enterotossiche (= crea danni all'intestino) che il micro sviluppa quando viene a contatto con gli alimenti. Sono termostabili quindi se prodotta prima della cottura dell'alimento permane e quindi non si ha sicurezza con la cottura.

La patologia è una intossicazione quindi è dovuta alla tossina non al micro e perciò non si può parlare di dose infettante. Vi è cmq una relazione tra i gr di tossina e il n° di cellule che devo ingerire e in particolare devo ingerire minimo 10^6 cell/gr per assumere il quantitativo di tossina che mi dà la patologia. Il micro deve avere quindi il tempo di riprodursi e di produrre la tossina nell'alimento, e questo avviene in tempo minore a T più elevate, quindi questa patologia è più frequente in estate.

È una patologia gastrointestinale più acuta, più dolorosa e più rapida rispetto alla Salmonellosi. Nei casi più gravi i sintomi sono molto acuti (nausea, vomito, diarrea) e bastano poche ore per la comparsa dei sintomi (perché mangio la tossina già preformata). Si ha cmq una durata breve e una remissione spontanea. Si attua una cura sintomatica, come reintegrazione salina.

Può dare anche patologie non alimentari come infezioni cutanee, acne, infezioni da ferita e in questi casi è il micro non la tossina che crea problemi quindi si possono usare antibiotici. (penetra da ferite)

Le tossine possono comportarsi da superantigeni quando entrano nel circolo sanguigno.

↓

solitamente l'antigene viene catturato da particolari cellule che lo portano fino a linfociti così che questi lo identifichino e producano un anticorpo adatto ad esso. Questi superantigeni fanno però sì che l'attacco tra la cellula che presenta e il linfocita non sia corretto e ciò porta ad una produzione continua di anticorpi come se l'antigene presentato fosse molto serio, molto grave per l'organismo, cosa che non è. Questo porta un malessere generalizzato, una infiammazione generalizzata conosciuta come TSS = sindrome da shock tossico in quanto il sistema immunitario percepisce un pericolo + grande di quello che è in realtà (si aziona non 0,1% del sistema cm avviene per un antigene normale ma il 10%).

Condizioni che favoriscono il patogeno:

- scarsa refrigerazione
- preparazione molto anticipata dei cibi
- scarsa igiene personale
- uso prolungato di piatti riscaldanti
- cottura inefficiente (se il micro ha già prodotto la tossina)

genere CAMPYLOBACTER

Uno dei batteri più importanti nel settore alimentare, non tanto per la gravità della patologia che genera ma per la sua diffusione. Il nome deriva dal greco "kampyelos" = curvo.

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	SPIRILLI , BASTONCELLI ELICOIDALI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM -
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	AEROBI MICROAEROFILI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	MOBILI ANFITRICHI (due flagelli polari)

> classificazione

Vi sono più di 30 specie ma, per quanto riguarda quelle patogene, le più importanti sono:
- Campylobacter jejuni: quello più diffuso
- Campylobacter coli

N.B. Il nome della specie deriva dal luogo in cui sono stati isolati questi micro, e in particolare coli = dal colon e jejuni = dal digiuno

Il C. jejuni è il patogeno più frequentemente isolato nei casi sporadici di diarrea e per questo è in competizione con la Salmonella per avere il primo posto per n° di casi. Presenta però una differenza sostanziale con la Salmonella: questa provoca outbreaks, casi di più persone colpite mentre il C. jejuni provoca singoli casi.

> ecologia

Questo micro è stato rilevato solo in tempi recenti poiché presenta particolari esigenze ecologiche:
- sono AEROBI MICROAEROFILI; necessitano quindi di O_2 ma in quantità molto ridotte, la concentrazione di O_2 nell'atmosfera (20%) è eccessiva e quindi si sviluppano più facilmente sottovuoto. In laboratorio era allora difficile da isolare perché si utilizzava l'atmosfera per i micro aerobi o un ambiente anaerobio per i micro anaerobi, e il C. non poteva svilupparsi né da una parte né dall'altra (perché o c'era troppo O_2 o non ce n'era). Una condizione di microaerofilia (si abbassa la concentrazione di O_2, da 20 in atmo a 5%, e si alza quella della CO_2, da meno di 1 in atmo a 10%), ottimale per C, è ottenibile in laboratorio con dei kit simili a quelli utilizzati per i micro anaerobi, ma con minimi quantitativi di O_2.
- non si possono inquadrare in nessuna categoria di quelle stabilite in base alla T. Crescono con T ottimale di 42°C, quindi questa T è inquadrabile in un range mesofilo o tendenzialmente termofilo, ma non crescono a 48°C e non crescono sotto i 30°C (= non si sviluppa a T ambiente) e queste T sono anomale sia per i mesofili che per i termofili, quindi non appartengono né all'una né all'altra categoria. Resiste bene a T di refrigerazione e non è ucciso dal congelamento. $D_{55} = 1$ min e $z = 5°C$
- sensibili al sale (basta che la concentrazione salina sia maggiore del 2%).

> caratteristiche particolari

catalasi +, ossidasi +, sono esigenti dal punto di vista metabolico e il loro genoma è piccolo

> fonti di contaminazione

Ha come habitat l'intestino degli avicoli (polli e tacchini) ma non è patogeno per questi animali. Vive bene in questo ambiente proprio perché la T corporea degli avicoli è 40-42°C, T ottimale di sviluppo per il micro. La prevalenza del C. nell'intestino degli avicoli è molto elevata, nel 2010 in Italia ~ 63,3% (ogni 100 avicoli analizzati 63 ce l'hanno), quindi questa carne può facilmente portarsi dietro questi micro. La prevalenza del C. negli avicoli risulta addirittura superiore a quella della Salmonella nello stesso ambiente.

prevalenza: in campo biologico indica la % di presenza

> alimenti a rischio

Carni di avicoli, acque e latte crudo (per contaminazione secondaria)

> patologia

Comporta campilobatteriosi, tossinfezione che comporta sintomi di modesta gravità simili a quelli provocati dalla Salmonella come diarrea, vomito, coliti. Ha una durata limitata, la remissione è spontanea e viene prodotta una tossina colera-simile (= agisce sull'equilibrio ionico). Si ha una bassa dose infettante, centinaia o addirittura decine di cellule, e per questo la patologia è molto diffusa (per la Salmonella invece deve essere presente in elevate concentrazioni, deve avere il tempo per riprodursi e quindi tutto l'alimento sarà pieno di micro quindi tutti coloro che ne mangiano saranno colpiti, ciò spiega come mai S. fa outbreak) Per il C. dato che servono meno cellule per dare la patologia, non occorre che si sviluppi nell'alimento quindi verrà colpito solamente chi va a mangiare la porzione contaminata, gli altri no.

Casi di C. sono più diffusi nei mesi estivi perché T più alte e quindi più facile che si sviluppi

L'infezione da C. può dare una seria complicazione a lungo termine, detta sindrome di Guillain-Barré

patologia neurologica che crea una paralisi progressiva che è legata in alcuni casi alla tossinfezione di C. jejuni. Settimane dopo la manifestazione della campilobatteriosi si può avere questa patologia in quanto il nostro organismo produce anticorpi per il C. e questi possono avere conformazione compatibile anche con alcune terminazioni nervose. Quando quindi gli anticorpi entrano nel circolo sanguigno vanno ad attaccare anche le terminazioni, creando paralisi degli arti. Questa malattia autoimmune è reversibile, basta eliminare gli anticorpi, però il fatto che essa si generi da una campilobatteriosi è raro. Quando è dovuta ad altri agenti risulta più grave e ~15% delle persone colpite rimane paralizzato.

genere CLOSTRIDIUM

Genere tra i più eterogenei per i batteri di interesse agro-alimentare e infatti è un genere ubiquitario = riscontrabile dappertutto, in entrambi gli habitat in cui possono trovarsi i micro di interesse alimentare, cioè suolo e intestino o organismo animale. Questi micro possono produrre diverse sostanze (tossine, acidi, solventi), e per questo sono molto sfruttati industrialmente, ma possono anche svolgere reazioni molto diverse: vi sono infatti ceppi in grado di degradare la cellulosa (questi vivono nel rumine dei ruminanti e permettono ad essi di digerire), oppure ceppi proteolitici.
Le specie più importanti sono:

1- C. BOTULINUM] patogeni alimentari
2- C. PERFRINGENS]
3- C. TETANI: agente eziologico del tetano e la sua patologia ha lo stesso bersaglio della patologia botulinica ma va ad attuare una azione opposta sul bersaglio.
4- C. DIFFICILE: NON è un patogeno alimentare ma si trova nell'intestino dell'uomo e degli animali, dove solitamente è tenuto a bada dalla microflora. Quando si usano però gli antibiotici, la microflora viene danneggiata mentre i ceppi di questo micro, alcuni antibiotico resistenti, sopravvivono e iniziano a svilupparsi e a produrre una tossina che dà, nt nei bambini, "colite da antibiotici".
5- C. TYROBUTYRICUM: specie deteriorante, nt nei formaggi, in cui provoca con la lunga stagionatura un gonfiore tardivo dovuto alla produzione di gas con la fermentazione butirrica. È responsabile dei buchi nel formaggio, come nell'emmenthal.
6- C. BUTYRICUM: specie deteriorante;
7- C. ACETOBUTYLICUM: molto utilizzato a livello industriale in quanto è in grado di fermentare l'amido e gli zuccheri per dare acetone, etanolo e butanolo, solventi importanti; sono anche termostabili quindi si lavora a T alte.
8- C. THERMOCELLUM: anche questo utilizzato industrialmente in quanto produce cellulasi, enzimi termostabili che degradano la cellulosa in glucosio, poi utilizzato per produrre bioetanolo.

(1) C. BOTULINUM

Micro imp. per la serietà della patologia che provoca più che per la diffusione. Risulta un problema nt per le produzioni casalinghe ed artigianali, mentre a livello industriale è molto conosciuto e controllato anche attuando processi molto drastici.
Il nome della specie deriva dal luogo in cui sono stati isolati i primi micro quindi nelle salsicce (infatti botulus = salsiccia in latino) e si tratta di una specie molto variegata.

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM +
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	SPORIGENI (le spore hanno posizione apicale o sub apicale e per questo i micro durante la fase sporigena assumono una forma a clava)
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI STRETTI (l' O2 è per loro un veleno,se c'è muoiono o il loro sviluppo è molto rallentato!!!)
CAPACITA' DI MOVIMENTO	IMMOBILI

> classificazione

la specie si suddivide in 4 gruppi distinti in base alla patogenicità dei ceppi:

I patogeni per l'uomo e proteolitici (= capaci di degradare le proteine)
II patogeni per l'uomo e NON proteolitici
III patogeni per gli animali ma non per l'uomo
IV non patogeni

si distinguono poi 7 sierotipi, distinti in base alla reazione antigene-anticorpo dovuta alle diverse tossine da loro prodotte:

A nocive per l'uomo prodotte dal gruppo I
B nocive per l'uomo prodotte dal gruppo I e II
C1, C2, D prodotte dal gruppo III
E nocive per l'uomo prodotte dal gruppo II
F nocive per l'uomo prodotte dal gruppo I e II
G prodotte dal gruppo IV

> ecologia

GRUPPO I

- range termici di sviluppo
  Sono mesofili e hanno come Tminima = 10°C quindi NON si sviluppano in frigo
- spore
  più termoresistenti e infatti D100 = 25 min e quindi la cottura NON garantisce l'eliminazione di queste spore!!

GRUPPO II

- range termici di sviluppo
  Sono mesofili e hanno Tminima = 3,3 °C perciò sì sviluppano in frigo
- spore
  Meno termoresistenti e infatti D100 < 0,1 min e quindi la cottura garantisce la loro eliminazione

caratteristiche comuni in entrambi i gruppi per quanto riguarda l'ecologia, sono:

- pH
  Non cresce MAI a pH < 4,6!! Questo è accertato da un quantitativo molto elevato di dati scientifici e quindi anche secondo la legge se a pH < 4,6 vi sono spore di C.B. non è 1 problema
- habitat
  È molto diffuso nel terreno e quindi tutto ciò che arriva dal terreno può essere contaminato. Sono allora più a rischio i prodotti di origine vegetale e questo non solo perché crescono nel suolo ma anche perché presentano pH > 4,6!!

> caratteristiche particolari

Questo micro NON è legato alla produzione di gas!! Vi sono ceppi che producono gas ma la maggior parte non lo fa e quindi, se una confezione risulta rigonfia, ciò non è per forza dovuto al C. botulinum!! È sicuramente alterata da qualche micro e per questo va gettata. Se invece la confezione non è rigonfia non significa che non è presente il C. botulinum, ciò non mi dà la certezza assoluta del fatto che il botulinum non vi sia, proprio perché vi sono moltissimi ceppi che non producono gas.

> patologia

La patologia è il botulismo, intossicazione dovuta quindi alla produzione della tossina botulinica. Se infatti si ingeriscono le spore o i micro non vi sono problemi negli individui adulti in quanto non germinano né si riproducono nell'intestino. Vi sono 3 / forme di botulismo:

A alimentare

legata all'assunzione di alimenti dentro cui vi è la tossina prodotta dal micro.

catena leggera light: + corta
catena pesante: + lunga heavy

sintetizzata come protossina = singolo polipeptide che poi si ripiega con un ponte disolfuro. Questa è la forma inattiva e per attivarla si deve rompere il ponte disolfuro e il polipeptide così da ottenere due polipeptidi separati. Ciò può essere fatto da:

- proteasi batteriche per il gruppo I, prodotte dagli stessi micro
- enzimi digestivi del lume intestinale, come la tripsina, per il gruppo II che NON è quindi in grado di attivare autonomamente la tossina come fa invece il gruppo I

È una delle tossine più tossiche in natura e infatti dose letale = 0,1 - 1 μg!! Questa tossina NON è termoresistente e quindi bastano 10 min a 80°C per distruggerla. Si hanno comunque numerosi problemi perché sono provocati da alimenti non cotti o contaminati successivamente.

la tossina agisce a livello delle terminazioni nervose: all'interno delle terminazioni nervose il segnale procede per via elettrica, mentre dalla terminazione ai muscoli è trasmesso per via chimica con l'emissione di acetilcolina. La tossina botulinica inibisce la produzione di acetilcolina quindi i segnali di contrazione non sono più trasmessi ai muscoli e ciò dà paralisi flaccida. Questo è grave nH per i muscoli respiratori, per il diaframma, che devono sempre funzionare!!
Problema grave dovuto a questa tossina è quindi l'incapacità di respirare.
Tempi di incubazione: 12-36 ore. Si hanno sintomi neurologici lievi all'inizio, come formicolii, difficoltà di mettere a fuoco, difficoltà di parola, che poi possono aggravarsi e questo passaggio è tanto più rapido tanta più tossina ho ingerito.
Questa intossicazione si cura con una antitossina e la diagnosi viene attuata con saggi immunoenzimatici. Il veicolo è l'alimento

N.B. Il rilascio di acetilcolina viene bloccato con l'emissione di glicina. La tossina del C. tetani è in grado di bloccare il rilascio di glicina e quindi i muscoli non si decontraggono più, rimangono sempre contratti. Ciò è detto paralisi spastica: è anch'essa una patologia neurologica e la tossina e i micro possono entrare nell'organismo solo da ferita, non è l'alimento il veicolo

B infantile

Tossinfezione che colpisce i bambini sotto i 6 mesi d'età: se vengono ingerite le spore, queste sono in grado di germinare, in quanto la flora intestinale non è ancora ben sviluppata, e i micro vanno a riprodursi e a produrre la tossina (attuano cmq uno sviluppo lento poiché l'ambiente non è ideale). L'alimento più legato a questa patologia è il miele: le api sono glicifere = mangiano sostanze zuccherine come il nettare prodotto dalle piante, e ricercando il nettare trasportano in giro frammenti diversi che possono essere anche contaminati (di solito si hanno 1-10 spore/kg). Quindi è sconsigliato dare miele ai bambini di età inferiore a 1 anno. Questo vale per il miele artigianale mentre per quello industriale non vi sono problemi.

C da ferita

In questo caso non è l'alimento il veicolo di tossina o micro, come era invece nei due casi precedenti, ma il micro entra da ferite. Ciò provoca sintomi simili alla patologia alimentare ma il tempo di incubazione (= tempo comparsa sintomi) è maggiore, 5-15 gg, in quanto il micro deve prima conquistare l'ambiente, deve sconfiggere le difese del nostro organismo. In questo caso si parla di infezione.

> alimenti a rischio

Alimenti che possono essere contaminati dalla tossina botulinica sono:
- vegetali: in quanto sono a stretto contatto con il suolo, habitat del C. botulinum;
- carne e pesce: contaminati durante la lavorazione o nelle fasi successive;
- prodotti fatti in casa: sono i più a rischio e i problemi possono derivare da:
  - se si usa il sott'olio perché è il modo ideale per creare anaerobiosi;
  - se si attua un trattamento termico errato;
  - se il livello di contaminazione della materia prima è molto elevato

  Sono a rischio nH le conserve e nH se sono di verdura, in quanto:
  - hanno bassa acidità (= pH alto);
  - sono conservate in assenza di ossigeno.

Profilassi che posso attuare per diminuire il rischio sono:
- abbassare il pH a valori inferiori a 4,6 (aggiungendo acido ascorbico, acetico...)
- trattare termicamente gli alimenti, considerando però che gruppo di C. può essere presente e a che T voglio conservare poi l'alimento.

se voglio conservare a T 10°C — spore I gruppo non germina; spore II gruppo germina e quindi tratto a 90°C per 5 min

se voglio conservare a T > 10°C — spore I gruppo germina, spore II gruppo germina] quindi tratto a 121°C per 3 min

- abbasso Aw aggiungendo sali o zuccheri, essiccando o congelando;
- lavare il meglio possibile la materia prima così da limitare la contaminazione;
- aggiunta di additivi, come nitrati e nitriti che inibiscono sia la crescita che la produzione di tossine;
- inserimento di micro antagonisti, come i batteri lattici usati in prodotti fermentati come crauti o salami. Questi batteri vanno infatti ad abbassare pH e a produrre batteriocine, sostanze innocue per l'uomo ma tossiche per gli altri batteri.

N.B. Nonostante la tossina botulinica sia una delle tossine più pericolose, se utilizzata in quantità molto minime può avere degli effetti positivi. Essa infatti comporta un rilassamento delle fibre muscolari, le decontrae e questo viene sfruttato per eliminare le rughe, dovute ad una continua contrazione muscolare. Questo trattamento è detto botox e viene usato sia in estetica si per curare alcuni problemi come i tic. Quando la tossina è stata smaltita dal nostro organismo tutto torna come prima.

2 C. PERFRINGENS

Anche questo sta acquisendo importanza negli ultimi anni in quanto causa di patologie gastro intestinali. Esso presenta anche caratteristiche particolari che gli conferiscono una elevata facilità di sviluppo in particolari tipologie di alimenti.

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM +
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	SPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI STRETTI (vi sono però alcuni ceppi aerotolleranti)
CAPACITA' DI MOVIMENTO	NON MOBILI (privi di flagelli)

> ecologia

È un micro tendenzialmente termofilo: cresce tra 20 e 50 °C e ha optimum tra 37 e 45 °C. A 45 °C è la condizione più ottimale e infatti il micro presenta velocità di replicazione molto elevata tanto che gli bastano 7-10 min per replicarsi. A questa T, quindi, la dose infettante viene raggiunta in un tempo molto minore.
È moderatamente alotollerante (2% NaCl) ma è inibito dai sali, come nitriti e nitrati.
È il micro più ubiquitario

→ si trova in quantità importanti sia nel terreno che nell'intestino umano. Proprio perché è molto diffuso nell'ambiente è uno dei micro utilizzati per determinare la potabilità delle acque. In particolare si ricercano i C. solfitoriduttori, in grado di ridurre i solfiti, che sono indice di contaminazione delle acque. Il C. perfringens è un solfito-riduttore, il C. botulinum NO!!

Le spore hanno $D_{100} = 60$ min quindi la cottura può eliminarle però si deve attuare una cottura a T adeguate, altrimenti vado a favorire la germinazione delle spore.

> caratteristiche particolari

Sono catalasi e ossidasi negativi, sono proteolitici (= producono enzimi che degradano le proteine) e sono produttori di gas.

> patologia

È una tossinfezione legata all'assunzione del micro in forma vegetativa. Quando il micro arriva nell'intestino, in quanto cambiano le condizioni ambientali, sporifica e ciò attiva i geni per la produzione della tossina. La dose infettante è molto alta, $10^7 - 10^8$ cellule, quindi il micro deve avere il tempo di riprodursi nell'alimento.
La tossina dà problemi gastro-intestinali simili a quelli della salmonellosi e i tempi di incubazione sono più brevi (8-12 ore) rispetto alle altre tossinfezioni in quanto la produzione della tossina dipende dalla sporulazione, processo molto rapido.
La tossina è termosensibile però ciò non è importante perché non devo inattivarla nell'alimento ma viene prodotta solo quando il micro sporigena nell'intestino.
Può dare cancrena gassosa = se vi sono incisioni profonde dei tessuti, come per esempio ferite da armi da fuoco, il micro vi può penetrare e li vive bene perché si crea un ambiente anaerobico. Il micro allora si sviluppa consumando il tessuto e ciò comporta produzione di gas.

> alimenti a rischio

Sia alimenti vegetali che animali presentano un elevato rischio di contaminazione, perché è un micro che si trova dappertutto, ma il rischio aumenta per i cibi complessi = costituiti sia da prodotti vegetali che animali. Altro problema sono i cibi cotti: la cottura uccide le forme vegetative ma alcune spore possono resistere e germinare a T di cottura e, non trovando nessun altro micro, crescono bene. Le spore germinano n^H se lascio raffreddare il cibo cotto a T ambiente in quanto con il calo della T si può raggiungere T tollerate dal micro o addirittura la T ottimale per il suo sviluppo. Lo sviluppo dei micro è favorito anche quando si hanno grandi quantità di cibo cotto, in quanto si sviluppa facilmente un ambiente anaerobico.

specie **LISTERIA MONOCYTOGENES**

Il nome del genere deriva da Lister, importante studioso di questo micro, mentre il nome della specie fa riferimento ad un comportamento particolare di questo micro, quello di conservarsi all'interno di globuli bianchi quando è presente nel nostro organismo.

> caratteristiche generali

MORFOLOGIA	BASTONCELLI CORTI (in alcuni casi così corti da sembrare coccobacilli)
REAZIONE ALLA COLORAZIONE DI GRAM	GRAM +
CAPACITA' DI CREARE FORME DI RESISTENZA	ASPORIGENI
METABOLISMO ENERGETICO	ANAEROBI FACOLTATIVI
CAPACITA' DI MOVIMENTO	MOBILI (ma NON per mezzo di flagelli)

> classificazione

Esistono ~10 specie e quella legata alla patologia è la monocytogenes. In laboratorio si usa la L. innoqua che, si capisce già dal nome, non è patogena ed è usata per determinare le caratteristiche del genere. Per quanto riguarda la monocytogenes si distinguono 12 sierovar e il 4b è quello più diffuso e **virulento** (responsabile di ~70% dei casi). La differenza con la Salmonella sta allora nel fatto che la L. ha pochi sierotipi e tra questi solo pochi sono patogeni, mentre la Salmonella ha moltissimi sierotipi e quasi tutti patogeni.

> ecologia

È un mesofilo e la Tottimale è 35-37°C = Tcorpo umano. Ha però anche spiccate tendenze psicrotrofe, e infatti cresce fino a 1-2°C quindi si sviluppa anche in frigo!!
Non resiste invece ai trattamenti termici e infatti $D_{70} = 1-4$ sec.
Il pH ottimale è vicino alla neutralità e non si sviluppa se pH<4,5. Non si sviluppa se Aw<0,94 e sono meno soggetti alla inibizione da nitriti.
L. è presente nel suolo ma si diffonde anche in tante altre superfici dove si mantiene. La presenza di L. non è allora infrequente e questo è positivo in quanto il nostro organismo vi viene a contatto diverse volte e quindi può generare piccole dosi di anticorpi. Questo spiega perché la patologia causata da L. è poco frequente, perché dato che ci sono pochi sierovar è facile che il nostro organismo **venga a contatto** con tutti e quindi esso avrà prodotto gli anticorpi necessari.

> caratteristiche particolari

Catalasi positiva, ossidasi negativa e emolitici (=rompono i globuli rossi SOLO L. monocytogenes)

> alimenti a rischio

Gli alimenti in cui si può trovare L. sono tutti, non esiste un alimento di riferimento. Può essere presente nel latte (perché L. può dare infezione patologica alla mammella delle bovine e quindi può essere già presente nel latte. Questa patologia può derivare dall'ingerimento di insilati contaminati o mal fermentati), anche in quello pastorizzato se viene contaminato dopo il trattamento termico. Può trovarsi nei formaggi molli perché Aw è alta, i batteri lattici non lavorano molto perché è breve il tempo di maturazione e quindi il pH non si abbassa molto e ciò favorisce lo sviluppo di L. Nei formaggi stagionati, invece, il rischio di contaminazione è minore poiché i batteri lattici sono più competitivi e più operativi e ciò ostacola lo sviluppo di L. Nei formaggi a crosta fiorita le ife delle muffe degradano la crosta e n^H degradano le proteine per dare ammino che possono essere a loro volta degradati per dare sostanze basiche che alzano leggermente il pH (ammine o ammoniaca). Tutto ciò favorisce lo sviluppo di L. Gli stessi ragionamenti si possono fare per i salami. Altri alimenti sono la carne bovina e suina (n^H se macinata), le verdure crude e n^H se ready to eat = prodotti di IV gamma e pronti da mangiare, che non devono essere cotti prima del consumo. In questi prodotti allora deve essere garantita l'assenza del micro o cmq se c'è non deve svilupparsi in quell'ambiente e questo è possibile applicando diversi ostacoli per il micro, come **cottura adeguata**, lavaggio adeguato della materia prima per abbassare la micro carica, particolare attenzione dalla fase di cottura a quella di confezionamento...

> patologia

È detta listeriosi ed è una infezione dovuta alla grande invasività dei micro. Quando arrivano nel circolo sanguigno sono riconosciuti dai globuli bianchi come sostanze estranee e quindi vengono inglobati per essere distrutti. La L. è però in grado di produrre delle molecole tossiche per il globulo bianco, le leucocitine, che uccidono il fagocita.
L. allora si conserva e si moltiplica all'interno del globulo bianco (che pur essendo morto mantiene la sua struttura esterna) passando inosservata alle altre difese, e una volta arrivata nei luoghi che predilige scatena la patologia. Questi luoghi sono:

- meningi: membrane che ricoprono il cervello e una loro infiammazione provoca la meningite. È la forma più frequente di manifestazione della listeriosi;
- fegato
- milza
- cuore

Se la L. è ingerita da donne incinte può dare problemi al feto. Questo in quanto trova nella placenta due condizioni che favoriscono il suo sviluppo:

- condizione di metaboliti che non si riscontrano in nessun altro posto (come per esempio l'abbondanza di eritrolo, zucchero di cui la L. è ghiotta);
- sorveglianza ridotta, difese immunitarie minori in quanto il feto è geneticamente diverso quindi, non essendo riconosciuto come proprio, l'organismo lo difende meno.

Nella madre, se la L. arriva alla placenta, si riscontrano lievi sintomi di tipo influenzale ma il feto può andare incontro a parto prematuro o morte (quindi aborto).
La donna in gravidanza è allora considerata una categoria a rischio per la L. e quindi è opportuno evitare i cibi più soggetti, quali formaggi e salumi poco stagionati.

La dose infettante è variabile rispetto allo stato di salute del soggetto colpito. Per le persone sane la dose è molto elevata ma per le persone che appartengono alle categorie a rischio la dose infettante è minore e quindi, avendo meno difese immunitarie, la probabilità di contrarre la listeriosi è maggiore.
È una patologia con morbilità e mortalità basse (= pochi casi per le persone sane) ma con letalità elevata (~30%) perché colpisce n^H persone che hanno già altri problemi e quindi le difese che possono mettere in campo sono deboli.
La listeriosi è curabile con antibiotici penicilline, che inibiscono la formazione, la sintesi della parete batterica.

Differenze tra Listeria monocytogenes e Salmonella

LISTERIA MONOCYTOGENES	SALMONELLA
Provoca LISTERIOSI, malattia molto seria ma poco diffusa	Provoca SALMONELLOSI, malattia molto diffusa ma poco seria
Microbo INVASIVO e molto diffuso	Microbo NON INVASIVO e molto diffuso
Presenta pochi sierovar e il nostro organismo vi viene spesso in contatto quindi può sviluppare degli anticorpi (per questo patologia poco diffusa)	Presenta moltissimi sierovar quindi il nostro organismo non può sviluppare degli anticorpi perché viene a contatto ogni volta con sierotipi diversi (per questo patologia molto diffusa)

N.B. La Listeria è mobile, pur non avendo flagelli, in quanto sfrutta la polimerizzazione delle fibrille di actina (proteina che assieme alla miosina costituisce i muscoli). Queste fibrille sono abbondanti nel citoplasma e la Listeria è in grado di polimerizzarle, di accatastarle così da creare strutture su cui spingersi per muoversi.

N.B. Il morbo di montezuma o sindrome del viaggiatore sono dei sintomi gastro-intestinali che colpiscono persone che si recano in paesi dove non sono ottimali le condizioni igienico-sanitarie. Non vi è un micro specifico che provoca questa patologia ma è dovuta al fatto che il nostro organismo viene a contatto con un numero rilevante di micro mai conosciuti e questi possono dare i sintomi. Questa patologia è causata da batteri (n^H E. coli enterotossigenici o salmonella, shigella e campylobacter) ma anche da virus, parassiti e micro non identificati. Alimenti a rischio sono frutta e verdura crudi, carne cruda o poco cotta, pesce, salse, latte, H_2O e alimenti lasciati raffreddare a T ambiente (anche perché di solito ci si trova in paesi con T elevate, che favoriscono lo sviluppo dei micro). La cura è sintomatica quindi non si usano antibiotici e non è consigliato usare farmaci contro la diarrea perché ciò fa fuoriuscire i micro e questo è positivo.

PACCHETTO IGIENE → serie di norme che stabiliscono i criteri da rispettare per la salubrità e la sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti.
Questo pacchetto è entrato in vigore il 1-gennaio-2006.
In particolare è importante il regolamento 2073/2005 che definisce i criteri microbiologici che vengono applicati alle analisi dei prodotti alimentari. Definisce in particolare dei limiti microbiologici da rispettare negli alimenti e ciò dà una maggior responsabilità al produttore, in quanto esso deve rispettare questi limiti oppure può non farlo ma deve allora dimostrare che cmq il prodotto è sicuro.
Consideriamo in particolare i livelli di Listeria monocytogenes stabiliti dal regolamento per i prodotti ready to eat. I diversi passaggi sono:

alimenti ready to eat
↓
chi consuma questi alimenti

- alimenti per lattanti
  ↓
  LIMITE: assenza in 25 gr di prodotto

- alimenti non per **lattanti**
  - alimenti che sono terreno NON favorevole alla crescita dei micro
    LIMITE: 100 ufc/gr
    ↓
    Il legislatore stabilisce che i terreni che NON sono favorevoli allo sviluppo della L. possono avere le seguenti caratteristiche:
    - pH ≤ 4,4
    - AW ≤ 0,92
    - pH ≤ 5 e AW ≤ 0,94
    - shelf-life < 5 gg

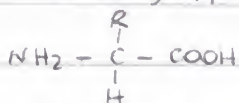
    Se il produttore dimostra che il suo prodotto rispetta una di queste caratteristiche può applicare il limite di 100 ufc/gr.
  - alimenti che sono terreno favorevole alla crescita dei micro. In questo caso il regolamento stabilisce che sta al produttore dimostrare scientificamente all'autorità competente che il prodotto non supera le 100 ufc/gr durante la sua shelf-life
    - il produttore riesce a dimostrare
      LIMITE: 100 ufc/gr
    - il produttore NON riesce a dimostrare.
      LIMITE: assenza in 25 gr di prodotto

    ↓
    Il produttore può verificare ciò con una serie di procedure dette challenge test = si contamina il prodotto artificialmente con una quantità superiore di micro rispetto a quella che ragionevolmente può presentarsi in natura e si monitora nel tempo come si evolve la carica microbica. Si verifica in particolare se la quantità di micro rimane entro il limite stabilito in tutta la shelf-life dell'alimento e questo lo si verifica applicando tutte le condizioni che favoriscono lo sviluppo dei micro, come una situazione di abuso termico, così da essere sicuro in ogni caso.

AMMINE BIOGENE

Molecole organiche con gruppo amminico NH_2 che hanno una reazione basica (alzano il pH) e che sono dette biogene in quanto prodotte da esseri viventi. In particolare derivano dalla decarbossilazione di ammino da parte di micro, quindi per avere ammine biogene nell'alimento ci devono essere ammino liberi e micro in grado di decarbossilarli.

→ ammino: atomo di carbonio chirale (= non sovrapponibile alla propria immagine speculare) + gruppo carbossilico (-COOH) + gruppo amminico ($-NH_2$) + H + R (gruppo laterale ≠ per ogni ammino)

$$NH_2 - \underset{H}{\overset{R}{C}} - COOH$$

→ micro: vanno a decarbossilare gli ammino in quanto le ammine ottenute hanno una reazione basica, cioè alzano il pH esterno favorendo lo sviluppo dei micro.

Si distinguono due tipologie di ammine:

(A) aromatiche = hanno un anello benzenico
Quelle di interesse alimentare sono:
- istammina (da istidina)] più diffuse
- tirammina (da tirosina)] più diffuse
- triptammina (da triptofano)

(B) alifatiche = hanno una struttura lineare
Quelle di interesse alimentare sono:
- putrescina (da arginina)
- cadaverina (da lisina)

Queste danno note organolettiche non piacevoli ma il loro nome fa riferimento alla loro genesi: derivano infatti da ammino liberati con la degradazione delle proteine durante la putrefazione della sostanza organica.

Vi sono alcune ammine che svolgono importanti funzioni nel nostro organismo:
- neurotrasmettitori: come adrenalina e acetilcolina;
- sintesi e stabilità degli acidi nucleici: come spermina e spermidina (così dette perché presenti negli spermatozoi)
- azione sul sistema vascolare: in particolare vanno a regolare la P sanguigna nelle arterie e sono:
  + tirammina: ha azione ipertensiva = vasocostringe quindi + P
  + istammina: ha azione ipotensiva = vasodilata quindi - P

Però le ammine possono anche provocare diversi sintomi se nostro organismo:

a- cutanei: i più frequenti come edema (= rilascio di liquido nei tessuti, tipico effetto dell'istammina), orticaria, rossore, infiammazione localizzata e manifestazioni esantematiche (= eruzione cutanea simile ai brufoli);

b- gastro-intestinali: meno frequenti, meno tipici per le ammine;

c- emodinamici: ipo e ipertensione;

d- neurologici: cefalea (dovuta ad una variazione della P) e palpitazioni (tachicardia = batte più forte, bradicardia = batte più lento).

Questi sintomi sono cmq di media entità e scompaiono in breve tempo.

Le ammine biogene sono prodotte n^H da batteri e questi possono essere divisi in due categorie

[1] batteri che producono le ammine che NON devono essere presenti nell'alimento
Sono batteri alteranti come Enterobatteriacee (es: E. coli), Clostridium e Pseudomonas (batterio alterante più diffuso).

[2] batteri che producono le ammine che devono essere presenti nell'alimento
Sono batteri lattici che devono essere necessariamente utilizzati nei prodotti fermentati quali vino, salami e formaggi, sono indispensabili per ottenere questi prodotti ma vi sono alcuni ceppi che producono ammine.

Quindi affinché siano prodotte queste ammine, nell'alimento ci devono essere:

> micro: ceppi in grado di produrre gli enzimi di decarbossilazione = decarbossilasi

> disponibilità di ammino liberi: questi possono derivare da proteolisi, come avviene nei formaggi, oppure possono essere presenti naturalmente nell'alimento, come in alcuni pesci che hanno fino al 2% di istidina libera)

> condizioni per lo sviluppo dei micro: vi devono essere condizioni favorevoli per lo sviluppo in quanto la produzione di ammine è un'azione del metabolismo secondario, che appunto avviene quando il micro si trova in condizioni favorevoli. Vi deve essere pH ~ 5-6 e T non basse, 20-37 °C.

Il nostro organismo è in grado di degradare le ammine grazie agli enzimi amino-ossidasi, che tolgono la parte amminica inserendo un ossigeno così da dare aldeidi. Questo sistema di detossificazione può essere rallentato o bloccato da alcune sostanze introdotte nel nostro organismo, cm farmaci (n^H psicofarmaci, antidepressivi) o alcol.

↓ sostanze: dette MAO (monoammino ossidasi) inibitori

Alimenti che possono contenere ammine biogene sono:

+ pesci: n^H della famiglia Sgombridi come tonno, alici, sardine, sgombro. Questi pesci possono presentare tra le squame dei micro che, finché il pesce è vivo, sono tenuti a bada ma quando il pesce muore si sviluppano e sfruttano l'elevato quantitativo di istidina libera per produrre istamina. Ciò comporta "scombroid poisoning" = avvelenamento da sgombro, intossicazione molto frequente che avviene quando il pesce non viene conservato correttamente e quindi la presenza di ammine biogene è indice di alterazione dell'alimento.

+ cibi fermentati: come formaggi, insaccati, vini, birra, crauti nei quali i micro sono necessariamente presenti sennò nn si avrebbero questi prodotti. Comunque non tutti i cibi fermentati contengono lo stesso quantitativo di ammine: più tempo i micro stanno a contatto con il prodotto e più ammine producono quindi più l'alimento è stagionato più può essere ricco di ammine. Allora:
  - per i formaggi
    Quelli freschi, come mozzarella, ne ha poche mentre quelli stagionati, come grana, provolone e parmiggiano ne hanno molte. Anche il gorgonzola, sebbene non sia molto stagionato, ne è ricco poiché le muffe presenti attuano proteolisi quindi i micro hanno a disposizione grandi quantità di ammino liberi. Si hanno qualche decina o centinaio di ppm di ammine e la più abbondante è la tiramina. Queste ammine possono dare "cheese reaction"
  - per i salami
    Anche qui più è stagionato più ammine vi sono e queste ammine possono andare a reagire con i nitrati per dare nitrosammine. Vi sn un centinaio di ppm di ammine.
  - per i vini
    Le ammine sono più abbondanti nei vini rossi perché questi vengono invecchiati. I batteri vengono inseriti in alcuni vini per attuare la fermentazione malolattica, attuato dopo la fermentazione alcolica e non per tutti i vini, n^H per quelli rossi, per dare una nota di morbidezza. Quindi solo nei vini in cui sono aggiunti i batteri si producono ammine.
    In questi vini vi sono qualche decina di ppm.

Nei casi precedenti le ammine sono prodotte dai micro ma vi sono anche alimenti che possono stimolare la produzione di ammine endogene, quali fragole, cioccolato, ananas, frutta tropicale, frutta secca... Noi ingeriamo continuamente ammine ma il loro livello di tossicità è difficile da determinare, posso mangiarne anche centinaia di mg e non avere problemi. Ovviamente se in una cena unisco più alimenti ricchi di ammine è più facile che si manifestino i sintomi.

BIOTOSSINE ALGALI

Tossine prodotte dai micro direttamente nelle acque oppure all'interno di alimenti coltivati in acqua come i pesci (ingeriscono i micro, questi producono tossine non nocive per loro che sono immagazzinate e che intossicano chi consuma quel pesce). Questi micro colpiscono n^H i molluschi, i pesci delle barriere coralline (cm barracuda) e il pesce palla. La presenza di questi micro è indipendente dalla freschezza del pesce o da una contaminazione con materia fecale delle acque, sono naturalmente presenti e il loro sviluppo è favorito dall'eutrofizzazione = eccesso di azoto e fosfati nelle acque (dovuto a concimi e detersivi che finiscono nell'acqua) che portano ad un eccessivo sviluppo di alghe.
I micro più importanti legati alla produzione di queste tossine sono eucarioti unicellulari che appartengono alla categoria delle alghe rosse = dinoflagellati che sono componenti basilari del plancton.
Altri batteri che producono le tossine sono cianobatteri (unicellulari fotosintetizzanti) e batteri marini associati alle alghe (come Vibrio).
Le patologie legate al consumo di molluschi bivalvi sono:

> **ASP**: amnesic shellfish poisoning
> Le tossine sono prodotte da diatomee ed è poco frequente

> **NSP**: neurotoxic shellfish poisoning
> Le tossine sono prodotte da dinoflagellati ed è poco frequente

> **DSP**: diarrhetic shellfish poisoning
> Le tossine sono prodotte da dinoflagellati ed è molto frequente. I micro producono acido okadaico che comporta una patologia gastro-intestinale lieve. Essendo un'intossicazione i sintomi compaiono rapidamente e scompaiono in 3-4 gg, può colpire anche gli animali e non è mai letale. Presente in laguna.

> **PSP**: paralytic shellfish poisoning
> Le tossine sono prodotte da dinoflagellati ed è molto frequente. È una tossina neurotossica che blocca il passaggio dello stimolo nervoso e ciò comporta paralisi. I sintomi compaiono subito e non vi è un antidoto. La letalità è > 20% ma questi dinoflagellati NON sono presenti nei nostri mari.

> mitilismo: se consumo molluschi filtratori che possono contenere ammine biogene o biotossine algali o entrambe.

Le patologie legate invece al consumo di pesci sono:

- ciguatera: tossina prodotta da una lumaca marina che è mangiata da + pesci tropicali. La tossina si accumula n^H nelle viscere e per questo è importante pulire bene, ed è termoresistente. I sintomi sono inizialmente gastrointestinali poi più gravi con danni neurologici nn permanenti. Non vi è un antidoto.
- tetradotossina: prodotta da batteri che vive nell'intestino ai pesci "gonfiatori" della famiglia tetraodontidi (=4 denti)

VIRUS

Sono delle entità biologiche, NON sono degli esseri viventi in quanto non presentano le 2 caratteristiche fondamentali per essere tale:
- non metabolizzano
- non sono in grado di riprodursi autonomamente

Per fare ciò infatti devono sfruttare l'ospite in cui si trovano quindi sono veri e propri parassiti

↓

cellule del nostro organismo e, in particolare per i virus enterici, che sono quelli di interesse alimentare, le cellule della mucosa intestinale. Questi virus devono quindi essere ingeriti per creare dei problemi e quindi l'alimento diventa un mezzo di trasporto (non un luogo dove riprodursi come avveniva per i batteri).

D: virus: involucro che racchiude il materiale genetico (DNA o RNA a singolo o a doppio filamento). La struttura proteica che racchiude è detta capside che presenta diverse forme ed è costituita da unità dette capsomeri. All'esterno del capside vi può essere un ulteriore rivestimento e allora si parla di virus con rivestimento o con envelop, se invece non è presente si parla di virus nudi o naked.

I virus sono frequente esempio di contaminazione secondaria e l'alimento può essere contaminato o dall'uomo o dall'H_2O (oppure l'alimento può non essere implicato e il contagio avviene con il contatto con una persona portatrice di questi virus). Quantitativamente è la categoria che dà più problemi per quanto riguarda le patologie alimentari. La dose infettante è molto bassa, 10-1000 particelle virali e nelle feci di una persona infetta si hanno 10^8 virus/gr.!!

Sono molto resistenti alle T basse ma le T elevate li inattivano (= destrutturano il virus. NON posso dire li uccide perché non sono vivi!!). Anche valori molto bassi di pH li inattivano.

I virus NON fanno colonie!! Per verificare la loro presenza si utilizzano dei batteri sensibili a quel virus, che vengono inseriti in un mezzo di crescita ideale per quel batterio (detto indicatore). Inserisco poi un campione dell'alimento cui voglio verificare la contaminazione e copro il tutto con una soluzione leggermente agarizzata. Metto ad incubare alla T ideale di crescita del micro indicatore e dopo 24-48 h osservo la piastra: se si formano delle aree trasparenti, dette placche divisi, significa che il virus era presente. In queste placche, infatti, il virus è andato ad uccidere i batteri presenti (che sennò si sarebbero sviluppati su tutta la piastra) entrando al loro interno dove si è riprodotto attuando il ciclo litico. Per sapere quanti virus sono presenti basta contare il n° di placche che si è formato, e l'unità di misura utilizzata è pfu = placche forming units = unità formanti placche.

A) EPATITE

Malattia del fegato, che è presente in diverse tipologie, molto differenti tra loro sia per la severità della patologia che comporta sia per le modalità di aggredire l'ospite.

via oro-fecale

Entrano attraverso l'alimento.
Sono la A, la più importante dal punto di vista alimentare, e la E

↓

questa epatite presenta una gravità lieve e l'esito è sempre benigno. Il virus dell'epatite A è indicato come **HAV** (hepatite A virus) ed appartiene alla famiglia dei Picornavirus (pico = piccole dimensioni, rna = materiale genetico racchiuso nella capside). Può essere inattivato con trattamenti con cloro delle acque e con trattamenti termici.

Tutti gli alimenti possono essere contaminati, basta che qualcuno o qualcosa (n^4 H_2O) vi porti il virus. HAV è più frequente cmq in molluschi, succhi di frutta (x H_2O), verdura cruda (se lavata o innaffiata con H_2O o seconcimata). Per evitare la contaminazione è allora fondamentale l'igiene!!

ALT = transaminasi, enzimi che lavorano nel fegato e che sono più abbondanti quando vi è un malessere di quest'organo

Vi sono altri Picornavirus che sono enterovirus = può dare sintomi gastro-intestinali, e sono:
- Coxsackie: dà sintomi vari
- Poliovirus: virus poliomelite che dà paralisi infantile.

via parenterale

Entrano per vie alternative, come ferite trasfusioni...
Sono la B, C e D

danno una patologia più grave, con problemi gravi a lungotermine come cirrosi o cancro al fegato.

> Patologia:

È l'epatite ed ha come bersaglio il fegato. L'incubazione è molto lunga (20-50 gg) quindi non del tutto agevole identificare la causa. I danni che il virus crea al fegato si manifestano come sintomi influenzali e itterizia = colore giallo epidermide dovuto all'eccesso di bilirubina (sost. prodotta dalla degradazione dei globuli rossi), che invece è solitamente smaltita dal fegato.
È una patologia molto diffusa e vi è un vaccino.
Si osserva che una persona infetta elimina micro con feci ancora prima di riscontrare i sintomi!!

B] **ROTAVIRUS**
Principale causa mondiale di diarree infantili gravi. Sono a trasmissione orofecale e derivano n# da H_2O inquinata da feci, che contengono fino a 10^{12} virus/gr. La dose infettante è molto bassa, 10-100 virus, e l'incubazione è molto rapida, ~2 gg. È una causa di morte principale per i bambini con meno di 5 anni (al secondo posto dopo le malattie polmonari) e interessa n# i paesi poveri o in via di sviluppo.

C] **NOROVIRUS**
Sono la principale causa di patologie legate agli alimenti!! Sono un gruppo recente che raggruppa ≠ tipologie di virus molto diffusi. Sono molto contagiosi, e la dose infettante è bassissima (10-100 pfu). Il tempo di incubazione è breve e i sintomi sono quelli assimilati alle influenze intestinali, a gastroenteriti.

ANALISI MICROBIOLOGICHE

Il loro fine è la ricerca dei micro o dei prodotti del loro metabolismo (es: tossine). Si possono fare sia analisi qualitative (se c'è o no il micro) sia quantitative (n° di micro presenti) e si distinguono 4 diverse tipologie di analisi:

1. CLASSICHE
Prevedono lo sviluppo dei micro, la loro coltivazione così da poter stimare quanti micro ci sn, quanti sono vivi e vitali. Sono analisi laboriose ma il dato che ricavo è molto preciso.
2. METABOLICHE - FISIOLOGICHE
Ricercano la presenza di una particolare attività che so essere legata alla presenza del micro, non ricerco il micro (es: attività β-glucuronidasica legata alla presenza di E. coli). Vi fa parte il test API. I tempi di risposta possono essere lunghi ma in alcuni casi, come il test della catalasi, sono molto rapidi
3. GENETICHE
Si basano sulla ricerca del DNA microbico poiché se c'è il DNA c'è anche il micro. Si utilizza n# la tecnica di amplificazione degli acidi nucleici = **PCR** e il vantaggio è che non occorre far moltiplicare il micro, posso ricercarlo direttamente nella matrice alimentare, e quindi ciò velocizza l'analisi. Lo svantaggio è che mi dice se ci sono micro ma non mi dice se sono morti o vivi, perché il DNA rimane sempre tal quale.
4. SIEROLOGICHE - IMMUNOENZIMATICHE
Si basano sul rapporto molto specifico tra antigene e anticorpo e proprio per questo sono in grado di identificare perfettamente i micro, fino a livello del sierotipo. È rapida, molto precisa ma costosa. Richiede però che la sostanza utilizzata sia antigenica = stimoli la produzione di anticorpi.

(1) Le analisi classiche possono essere attuate solo su micro coltivabili, vivi e vitali, e in base alle condizioni in cui metto la mia piastra cresceranno micro ≠.
Possono essere attuate, a livello aziendale, in diversi momenti della produzione:
- all'inizio del processo per verificare la qualità della materia prima
- durante il processo per stabilire i punti critici o per sistemare le diverse fasi
- alla fine del processo per garantire la sicurezza del prodotto

Vi sono delle metodiche ufficiali riconosciute da seguire, così da poter anche paragonare i miei dati con gli altri, e devo registrare i metodi seguiti per ogni campione.
Le diverse fasi da seguire per le analisi microbiologiche classiche sono:

> campionamento

Fase importante poiché in base a come lo faccio ho un campione più o meno rappresentativo. Anche qui si devono seguire dei protocolli e le analisi ufficiali, attuate dai NAS o dalle USSL, devono essere fatte su 4 aliquote per garantire il corretto campionamento e per tutelare il produttore. Infatti solamente due aliquote vengono analizzate mentre le altre sono conservate dall'azienda e dall'autorità giudiziaria (che la utilizza se si va in giudizio). Fase molto importante è il prelevamento del campione in quanto è importante evitare la trasmissione di altri micro, l'inquinamento del campione. Per questo si utilizzano oggetti sterili e si deve essere rapidi.

> trasporto

Può volerci tempo e ciò può favorire la moltiplicazione dei micro. Deve allora essere il più veloce possibile e si devono utilizzare T di refrigerazione per rallentare o arrestare la crescita dei micro. Tutte le normative vietano il congelamento perché ciò può danneggiare i micro e quindi quando attuo l'analisi potrei fare una sottostima.

> preparazione del campione

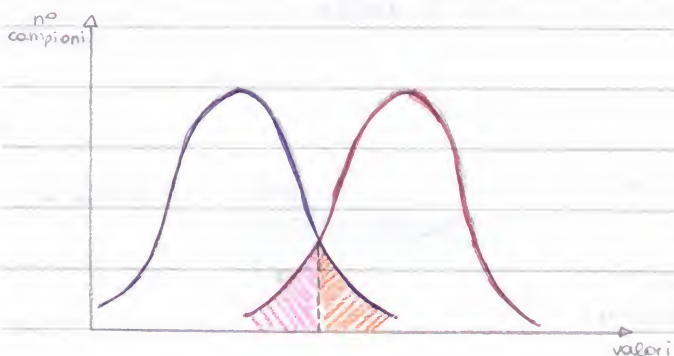
È importante evitare anche in laboratorio contaminazioni. Se il prodotto è solido si usa lo stomacher omogenizzatore meccanico a pale che favorisce il passaggio dei micro dal solido al liquido. Poi i campioni sono diluiti e seminati su piastre petri.

con le analisi classiche si possono ricercare tre tipologie di micro:
- micro positivi: indicatori di tipicità. Sono micro tipici di un prodotto o di una zona di produzione
- micro non positivi: indicatori di qualità. Sono micro non patogeni ma deterioranti, alteranti le caratteristiche organolettiche del prodotto. Indicano che le condizioni igienico sanitarie il cui si è svolto il processo di produzione non sono state ottimali.
- micro patogeni: indicatori di salubrità

specificità: parametro che mi permetta di determinare la presenza dei micro (es: torbidità)
precisione: riproducibilità dell'analisi, cioè ogni volta che faccio l'analisi trovo dati molto simili tra loro. Questi dati sono però distanti dal valore reale a causa di errori sistematici = errore di procedura che si ripete sempre uguale.
accuratezza: attendibilità del dato ottenuto, cioè la media dei dati ottenuti è vicina al valore vero. In questo caso i dati non coincidono con il valore reale per errori casuali.

Con le analisi microbiologiche classiche posso ottenere 4 diversi risultati:

n° campioni

valori

- negativi
- positivi
- falsi negativi
- falsi positivi

Noi dobbiamo preoccuparci n° dei falsi negativi perché in questi alimenti il patogeno c'è ma l'analisi non me lo rileva e quindi posso mettere in commercio un prodotto non sicuro!! Per i falsi positivi, invece, si ha solo una perdita commerciale perché l'analisi mi indica che ci sono patogeni quando in realtà non c'è e quindi getto un alimento in realtà commercializzabile. Generalmente si individua un limite di accettazione dell'analisi così da diminuire il rischio di prodotti non conformi in commercio (xò così ho più perdite commerciali!!).

Per le analisi microbiologiche si usano terreni di coltura venduti con una composizione codificata (= testati e certificati che sono adatti per la crescita di un determinato micro). Possono essere:
- SOLIDI: sono capsule petri in cui la semina può essere fatta
  - in profondità: prima metto il campione poi il mezzo. I micro crescono allora in anaerobiosi e si può seminare 1 ml.
  - in superficie: prima metto il mezzo e poi vi spalmo il campione. In questo caso si possono seminare 1/10 di ml (non di più perché sennò non si assorbe) e tutti i micro crescono a contatto con O_2.
- LIQUIDI: sono provette o tubi di coltura in cui la presenza dei micro è rilevata da modificazioni del mezzo come torbidità o produzione di gas

calcolo della carica microbica:
- media dei campioni
- moltiplico la media per il reciproco della diluizione

es: diluizione: 10^{-4}
n° colonie dopo diluizione: 102 104 106

carica microbica campione $= \text{media} \cdot 1/\text{diluizione}$
$= 104 \cdot 10^4$
$= 1,04 \cdot 10^6$ ufc/ml

NON POSSO diluire troppo, devo avere un n° di colonie compreso tra 300 e 30

300: non superiore perché incontabile

30: non sono più rappresentative della carica effettiva perché ogni colonia è molto grande e se sbaglio di una colonia in + o in − faccio un errore molto elevato, del doppio.

N.B. La diluizione si attua se ho troppe cellule e devo diminuire il loro numero però vi sono casi in cui il n° di cellule sia troppo piccolo e quindi devo concentrarle. Posso attuare ciò filtrando il campione liquido così da raccogliere i micro e poi posizionerò il filtro su di una capsula petri dove vi è il terreno per far crescere i micro. Il filtro ha pori di 0,45 µm e per facilitare la filtrazione si crea il vuoto nel recipiente sottostante.

N.B. Poiché le capsule petri sono ingombranti e costose si possono usare petrifilm, foglio di carta con uno strato leggero di terreno. Vi sono poi piastre con un foro centrale su cui viene fatta ruotare una struttura che sparge i micro e lo fa diluendo sempre più il campione.

Test **MPN** (most probable number)
permette di misurare la crescita in base alla torbidità del mezzo: si attuano diluizioni decimali sui diversi tubi per ridurre la torbidità ma basta la presenza di un unico micro vivo e vitale per dare torbidità. Bisogna fare un certo n° di ripetizioni, 3 o 5, e per valutare il risultato devo stabilire quanti tubi torbidi ho per ogni ripetizione.
Da laboratorio:

diluiz.	rip 1	rip. 2	rip. 3	n° torbidi
0	+	−	+	2
−1	+	+	+	3
−2	−	+	−	1
−3	−	−	−	0
−4	−	−	−	0

+ = torbido − = non torbido

Devo scegliere una tripletta di n° e parto dal n° con diluizione più spinta in cui si ha il n° massimo di positivi. Nel nostro caso parto da 2 perché è un dato anomalo perché gli dopo è più alto e quindi prendo la tripletta dove cresce e poi cala: 231

Devo poi conoscere la quantità in gr o ml di micro presente nella prima provetta e in base a ciò ricavo i risultati dalle tabelle. Nel nostro caso si parte con 0,01 gr di micro e dalle tabelle ricavo il n° 360 = MPN/gr. Nelle altre due colonne della tabella ottengo i valori in cui è compreso il valore che ottengo nel 95% dei casi.

I terreni di crescita possono essere:
- non selettivi: fatti per far crescere il n° maggiore di micro;
- selettivi: permettono solo la crescita di alcuni micro, gli altri non riescono a svilupparsi in quanto o mancano le sostanze nutritive essenziali o perché vi sono sostanze inibenti.
    - sali biliari: tensioattivi tossici per gram +
    - alcuni coloranti: mal tollerati da gram +
    - alcuni antibiotici
- differenziali: permette la crescita di diverse specie che sono però tra loro distinguibili. Sono molto utilizzati per uno screening preliminare.

L'articolo **268** del Testo Unico sulla Sicurezza sul Lavoro (ha sostituito legge 626) classifica gli agenti biologici in base alla loro pericolosità:
- GRUPPO **1**: micro non pericolosi, con poche probabilità di causare malattie in soggetti umani
  Es: micro dello yogurth o dei salami detti micro **GRAS** = generalmente riconosciuti come sicuri.
  Tutti i laboratori sono abilitati alla loro manipolazione
- GRUPPO **2**: micro che possono causare malattie a soggetti umani e costituiscono un rischio per i lavoratori. È però poco probabile che si propaghi e sono disponibili misure profilassiche e terapeutiche.
  Es: Campylobacter, Vibrio, Listeria, E.coli patogeni, Clostridium, Salmonella, Yersinia, Staphylococcus aureus, virus epatite A
- GRUPPO **3**: micro che possono causare malattie gravi a soggetti umani e costituiscono un serio rischio per i lavoratori. Può propagarsi ma sono disponibili misure di profilassi e terapeutiche.
  Es: Bacillus anthracis, E.coli O157:H7, Salmonella typhi, Y. pestis, epatite B, Shigella
- GRUPPO **4**: micro che possono causare malattie gravi a soggetti umani e costituiscono un serio rischio per i lavoratori. Può presentare elevato rischio di propagazione e NON sono disponibili misure profilattiche e terapeutiche.
  Es: virus Ebola

Studiamo le analisi microbiologiche partendo da quelle più generali per arrivare a quelle + specifiche:
Ⓐ CARICA MICROBICA TOTALE
Analisi più generale che ricerca tutti i tipo di micro che si possono sviluppare in un campione di alimento. Il terreno di crescita è il meno selettivo di tutti ed è indicato come **PCA** = plate count agar = agar per conta su piastra: è un mezzo complesso = contiene poche sostanze ma queste sono ricche di molti elementi, di molte molecole. Si usa glucosio come fonte di energia, come fonte di azoto (basilare per proteine e acidi nucleici) azoto organico (perché non tutti i batteri sanno usare azoto inorganico per prodursi ammino e quindi gli do l'azoto già pronto). (con gli zuccheri)
Aggiungo come fonte di azoto organico il triptone, concentrato proteico di caseine del latte e concentrati di carne, trattati con enzimi proteolitici per ottenere piccoli polipeptidi o singoli ammino.
Si inseriscono poi fattori di crescita (= sostanze indispensabili per la crescita ma che i micro non sanno produrre es: vitamine) con una coltura di lievito esausta (dopo che è stata usata tecnicamente. I lieviti sono in grado di produrre tt, anche vitamine (gli birra principale fonte vit. B), per questo li uso).

Semino poi per inclusione, così da permettere anche lo sviluppo degli anaerobi stretti, e poi incubo a 30-32 °C (così crescono i mesofili ma posso anche calcolare la carica psicrofila totale incubando a T inferiori, o la carica termofila totale incubando a T più elevate. Per i termodurici arrivo fino a 63°C).
E' importante stabilire il tempo di incubazione, devo stabilire dopo quanto tempo faccio il conteggio perchè più aspetto più le colonie si sviluppano. Stabilendo un tempo vado a contare gli che si sono sviluppate, gli che non si sono sviluppati pazienza perchè altrimenti dovrei dare un t infinito.
Vado a contare le colonie ma **NON** devo considerare le loro dimensioni.
La carica microbica elevata non è di per sé un dato negativo perchè vi sono alimenti, come gli fermentati (yogurt, salami), che devono contenere i micro e più ne hanno meglio è. Valori medi accettati sono 10^5-10^6 cfu/gr ma se si supera questi limiti significa che:
- le materie prime erano contaminate (se il prodotto che faccio non è soggetto a trattamenti termici).
- il processo attuato in condizioni igienico-sanitarie non adeguate

→ La carica microbica totale non è **MAI** correlata alla presenza di patogeni!!
Può invece indicare il livello di igiene del processo attuato ←

(B) COLIFORMI TOTALI o ENTEROBATTERI TOTALI

Analisi per la ricerca delle enterobatteriacee e dei coliformi.

- enterobatteriacee → micro che appartengono a questa famiglia che si individuano in quanto vanno a fermentare il glucosio producendo acidi e gas
- coliformi → batteri ad habitat intestinale simile a E. coli. Questa categoria era presente prima della famiglia delle enterobatteriacee ma oggi sono stati inglobati in essa. Questi micro individuati in quanto fermentano il lattosio dando acidi e gas.
Tutti i coliformi sono enterobatteriacee ma NON viceversa!!

Rispetto all'analisi precedente è più ristretta in quanto cerco solo batteri e solo della famiglia delle Enterobatteriacee. Poichè questi batteri sono stati isolati per la prima volta nell'intestino, si era convinti che fossero presenti solo lì, ma successivamente si è scoperto che sono molto abbondanti anche nell'ambiente. **Non** posso quindi affermare che se sono presenti coliformi o enterob. si ha sicuramente avuto una contaminazione fecale!!
Questi micro sono sensibili al calore, quindi con il processo di pastorizzazione vengono eliminati e per questo sono utilizzati come indicatori di efficacia dei trattamenti termici (non posso fare ciò con la carica totale perchè essa fa sviluppare anche micro termodurici e sporigeni, che resistono ai trattamenti).
Le cariche ammesse sono 10^2-10^3 cfu/gr, abbastanza elevata in quanto generalmente questi micro NON sono patogeni. Se però si ha una carica elevata significa che può esserci:
- contaminazione ambientale
- ricontaminazione post trattamento termico
- errata conservazione o trasporto (nel se non rispetto la T di refrigerazione poichè, essendo mesofili, si sviluppano se T si alza).

Queste analisi possono essere fatte su terreno liquido o solido, e per quello solido si utilizza:
- **VRBA** per i coliformi
Contiene coloranti, quali cristal violetto (V) e rosso neutro (R), e sali biliari (BA) (che inibiscono entrambi lo sviluppo dei gram +) e poi contiene lattosio. Se un micro è coliforme esso si colora di rosso e i sali biliari precipitano.
- **VRBGA** per le enterobatteriacee
Uguale al mezzo precedente solamente che al posto del lattosio ho glucosio

(C) COLIFORMI TOTALI

Altra modalità per ricercare i coliformi. In questo caso si usa la campanella di Durham (una provetta con dentro un altra provetta rovesciata) che permette di raccogliere i gas prodotti dai micro.
Il terreno utilizzato è il **BGB** = verde brillante di bile, che contiene lattosio, bile di bue e il colorante verde brillante. Inoculando i micro in questo terreno si osserva la loro crescita con l'aumentare della torbidità del mezzo e per verificare se questi micro sono in grado di produrre gas dalla fermentazione del lattosio, si osserva la formazione di bolle nella campanella.
Questa ha infatti il compito di raccogliere i gas prodotti dai micro e se vi si formano bolle ciò mi da la conferma che i micro presenti sono coliformi.
N.B. Quando metto una provetta dentro l'altra sicuramente rimangono dentro gas xò qnd metto in autoclave per sterilizzare, la P che si crea me li fa fuoriuscire.

D) COLIFORMI FECALI

Oggi si parla di coliformi termotolleranti, per la loro capacità di crescere a T superiori a quella a cui crescono gli altri coliformi, ma una volta erano definiti fecali in quanto erano stati isolati solo nelle feci (poi si è scoperto che sono abbondanti anche nell'ambiente e quindi è più giusto parlare di termotolleranti). Devono essere innanzitt positivi ai test precedenti dei coliformi totali ma essendo termotolleranti, una volta inoculati nel terreno **BGB**, vengono posti a 44°C (T più alta) così che possano crescere e che si possa controllare la produzione di gas. Viene poi inserito triptofano e se qst viene trasformato dagli enzimi microbici in indolo (lo vedo in quanto si utilizza un reagente che, se viene rotto dall'enzima cambia il colore da giallo a rosso) si tratta di coliformi fecali. (cromogeno di Kovacs)
La carica ammessa è fino 10^3 cfu/gr e questi micro:

- molto più probabile che la loro presenza indichi una contaminazione fecale, poiché sono scarse le probabilità di trovarli nel terreno, ma ciò non è certo;
- indicano un inquinamento recente, perché hanno vita breve negli alimenti;
- abbondanti nei formaggi e nelle carni macinate

E) E. COLI

Analisi ancora più specifica e questo micro è positivo a tutte le analisi precedenti. È interessante cm specie in quanto è il miglior micro indicatore di contaminazione fecale.

↓

micro che indicano un pericolo (qui la possibile presenza di batteri patogeni) che per essere tali devono:
- essere associato al patogeno, deve condividere lo stesso ambiente ottimale e quando c'è patogeno ci deve sempre essere il micro indicatore, NON viceversa!!
- rapidamente e facilmente rilevabile
- facilmente distinguibile dagli altri micro
- numericamente correlati con il patogeno, la proporzione deve rimanere costante
  es: nelle carni in media E. coli / salmonella = 10000 : 1

N.B. Non si cerca il patogeno perché ho una minor probabilità di trovarlo mentre ho più probabilità di trovare i micro indicatori perché sono presenti in maggior quantità.

Se si rileva E. coli nelle materie prime è molto probabile che esso indichi una contaminazione fecale, se invece lo si rileva sul prodotto finito è più probabile una contaminazione dovuta alla scarsa igiene.
E. coli è positiva ai test di coliformi totali e di coliformi fecali e la sua presenza è determinata dalla positività all'attività β-glucuronidasica

↓

enzima idrolitico che degrada i polisaccaridi e l'E. coli è l'unico coliforme che fa qst attività.
Lo si verifica utilizzando un substrato artificiale riconosciuto dall'enzima, il **MUG**, polimero costituito da zucchero e aglicone che viene scisso dall'enzima e aglicone, qui umbelliferie, da
→ fluorescenza: corpo colpito da una radiazione magnetica la riflette su una lunghezza d'onda diversa da quella iniziale incidente (in particolare è maggiore qll che esce perché si ha - energia). Corpi con qst capacità sono detti fluorofori o fluorocromi e solitamente si invia luce con lunghezza d'onda minore (= ultravioletto) e i fluorofori riflettono blu.

Le cariche ammesse sono fino a 100 cfu/gr

F) E. COLI O157:H7

Restrizione ancora maggiore in quanto ricerco un particolare sierotipo. Particolarità di qst sierovar è che ha caratteristiche molto diverse da quelle della specie a cui appartiene. Infatti:
- non cresce a 44°C → negativo al test dei coliformi termotolleranti
- non ha attività β-glucuronidasica → negativo al test E. coli
- non fermenta il sorbitolo: zucchero fermentato dagli altri coliformi e quindi sfrutto questa caratteristica per rilevare la sua presenza.
  Si utilizza un mezzo simile al VRBA ma con lo zucchero sorbitolo: tutti i coliformi lo utilizzeranno, e quindi si coloreranno di rosso creando attorno alla colonia l'alone di precipitazione dei sali biliari, ad eccezione del O157:H7, che quindi non si colora di rosso, rimane bianca e non si ha l'alone di precipitazione. Così ho fatto una analisi presuntiva, devo poi isolare il micro e metterlo in coltura pura per verificare che sia proprio quel sierotipo

(G) STREPTOCOCCHI FECALI

È un'analisi spesso richiesta ma il nome è fuorviante perché si vogliono analizzare i micro con forma a streptococco, non i micro che appartengono al genere Streptococcus!! Questi micro appartengono invece al genere Enterococcus

→ gram +, non sporigeni, forma di streptococco (catenelle di cocchi) ad habitat nH intestinale ma che sono presenti anche nell'ambiente quindi NON sono indicatori di contaminazione fecale!! → anche il 2° termine è fuorviante
Sono micro corazzati pur essendo gram+ e infatti sono termodurici (resiste a T elevate, di pastorizzazione $D_{65} = 5-30$ min). Rispetto agli altri micro:
- più resistenti ai disinfettanti
- più resistenti all'azione degli acidi
- più alotolleranti (fino a 6% NaCl)
- più resistenti alla mancanza d'H_2O quindi all'essicazione
- più psicrotrofi (2-8 °C) e alcuni resistenti al congelamento

proprio perché sono resistenti sia a T elevate che a quelle basse sono usati come indicatori di trattamento termico

(H) CLOSTRIDI SOLFITO RIDUTTORI

Si ricercano tra i clostridi quelli che hanno questa capacità e la specie di importanza alimentare che contiene ceppi in grado di attuare ciò è il C. perfringens. Questi micro riducono il solfito SO_3^{2-} a solfuro S^{2-} quindi nel mezzo viene messo solfito. Si aggiunge poi nel mezzo ferro citrato, così che questo reagisca con il solfuro per dare solfuro di ferro che precipita e che presenta un caratteristico colore nero. Poiché vi sono anche altri micro di altre specie solfito-riduttori e quindi nel mezzo sono inseriti anche antibiotici, tossici nH per i gram -. Quest'analisi è utilizzata come indice di contaminazione in quanto questi sono i micro più ubiquitari e in particolare è utilizzata per verificare la potabilità delle acque.

(I) STAFILOCOCCHI COAGULASI POSITIVI

Analisi attuata per ricercare lo Staphilococcus aureus, unico Stafilococco ad essere coagulasi positivo. Questo micro presenta degli enzimi in grado di coagulare il siero creando dei globuli di fibrina (sostanza utilizzata dal nostro sistema per tappare le ferite) e ciò viene sfruttato dal micro quando entra nel sangue in quanto si ricopre con questi ammassi di fibrina per difendersi dai macrofagi. Questa capacità può essere verificata con diverse analisi:
- coagulasi sul siero di coniglio
- verifico che la DNAsi sia termostabile: questo è un enzima che hanno tutte le cellule per degradare il DNA ma nello S. aureus è termostabile quindi riscaldo il campione e verifico che l'enzima non si sia degradato.
- crescita su mezzo Baird-Parker: mezzo contenente ≠ sostanze tra cui il bianco d'uovo dove viene fatto crescere il micro. Le colonie di S. aureus risulteranno di colore nero, per la riduzione del sale di tellurio, con un alone bianco attorno, per l'azione proteolitica attuata sul bianco d'uovo.

Posso verificare anche la motilità dei micro: si prende un mezzo poco agarizzato e per infissione con un ago sterile vi inserisco i micro. In base allo spostamento dei micro dal punto in cui sono stati inseriti verifico o meno la loro capacità di movimento.
Altre analisi che si possono attuare sn:
> fluorescenza: verifico questa capacità nei micro o nelle sostanze e ciò mi permette di distinguere i micro morti da quelli vivi e di riscontrare la presenza di alcune micotossine.
> misura dell'ATP: più ATP è presente più micro vi sono.
> impedometria: misura della conducibilità del mezzo. Lo sviluppo dei micro modifica la componente elettrolitica del mezzo perché i micro attuano depolimerizzazioni che aumentano il n° di elettroliti e quindi la conducibilità del mezzo.
> catalasi: enzima presente in alcuni micro che catalizza la reazione che trasforma H_2O_2 in H_2O e O_2. Il test quindi è positivo se il contatto tra il micro e l'H_2O_2 produce gas, si formano delle bolle e si dice che "l'acqua frigge"
> ossidasi: il citocromo-ossidasi è un enzima che interviene nella fase finale della catena respiratoria. Il test prevede l'utilizzo di uno stick la cui estremità è impregnata con il substrato per l'enzima: se messa a contatto con la colonia l'estremità dello stick cambia colore (da grigio a rosso) il micro è ossidasi positivo.

PIANI DI CAMPIONAMENTO

Il legislatore fissa dei limiti per le cariche microbiche negli alimenti e lo fa in base a:
- tipo di alimento (se fresco, acido, secco...)
- tipo di patogeno (in base al rischio e al pericolo)
- tipo di consumatore (se categorie a rischio o no)

La severità dei limiti aumenta n° in base alla gravità del pericolo e alla severità del rischio, infatti:
> pericolo assente: riguarda invece deterioramento, perdita caratteristiche peculiari nel prodotto
> pericolo basso indiretto: si è un elevato n° di indicatori
> pericolo moderato diretto a diffusione limitata: es intossicazione da S. aureus o B. cereus
> pericolo moderato diretto a diffusione potenzialmente ampia: es salmonellosi
> pericolo elevato acuto: es botulismo, colera

Il legislatore non si basa però solo sulla gravità del pericolo ma anche sulle condizioni successive in cui si conserva l'alimento e sul micro considerato e in base a ciò si possono distinguere 15 diversi casi, contraddistinti ognuno da:
- piano di campionamento: a 2 o a 3 classi
- **n** = n° di unità campionarie = n° di campioni da prendere per lotto. Di solito sono 5 e mi indica anche quanti gr o ml considerare.
- **m** = valori guida = valore in cfu/gr o cfu/ml che non deve essere superato dai miei n campioni
- **c** = n° di campioni di cui posso accettare il superamento del valore guida

si parla di campionamento A 2 CLASSI quando i valori che trovo possono essere distinti in base al fatto che siano sopra o sotto il valore guida. Si distinguono allora solamente due classi per i dati: dati sopra il valore guida e dati sotto il valore guida.

Es: Salmonella assente in 25 gr prodotto ⟶ n=5 m=0 c=0
se campioni: 0 1 0 0 0 non è accettabile perché c=0 quindi nessun valore deve superare il valore guida m=0

Es: n=5 $m = 10^2$ c=0
se campioni. 90 72 120 81 94 non accettabile perché c'è un valore sopra gli guida e dovrei averne 0

Nel caso invece di un campionamento A 3 CLASSI si prevede un altro valore oltre n, m e c:
- **M** = valore massimo ammesso, che non deve essere in nessun caso superato

In questo caso allora distinguiamo tre classi: dati sotto m, dati tra m e M e dati sopra M.
In questo caso c mi indica le unità campionarie che possono superare m ma non M.

Es: n=5 $m = 10^3$ $M = 10^4$ c=2
se campioni: $1{,}2\cdot10^3$ $5{,}6\cdot10^2$ $8{,}1\cdot10^2$ $2{,}4\cdot10^2$ $2{,}6\cdot10^3$ accettabile perché non ho nessun valore sopra M e si 2 sopra m, come dice c
se campioni: $6{,}6\cdot10^4$ $2{,}3\cdot10^3$ $6\cdot10^3$ $2\cdot10^2$ $9\cdot10^2$ NON accettabile perché ha un valore sopra M

Nei casi meno seri si utilizzano piani a 3 classi mentre per i casi più seri uso gli a 2 classi. Questo non perché il piano a 2 classi sia più restrittivo, anzi è meno restrittivo perché se vi sono dei valori sopra m non mi dice di quanto vanno sopra, cosa che invece fa il piano a 3 classi che mi indica che i dati sopra m possono arrivare al massimo a M. Si usano i piani a 2 classi in quanto essi hanno SEMPRE C=0 e ciò li rende più restrittivi dei piani a 3 classi (dove c>0 altrimenti diventa un piano a 2 classi) perché affermano che sopra m non deve esserci nessun dato.

	Condizioni successive di conservazione		
Tipo di pericolo	Riducono il rischio	Non modificano il rischio	Possono aumentare il rischio
Assente	Caso 1 3 classi n=5 c=3	Caso 2 3 classi n=5 c=2	Caso 3 3 classi n=5 c=1
Basso indiretto	Caso 4 3 classi n=5 c=3	Caso 5 3 classi n=5 c=2	Caso 6 3 classi n=5 c=1
Moderato diff. limitata	Caso 7 3 classi n=5 c=2	Caso 8 3 classi n=5 c=1	Caso 9 3 classi n=10 c=1
Moderato diff. ampia	Caso 10 2 classi n=5 c=0	Caso 11 2 classi n=10 c=0	Caso 12 2 classi n=20 c=0
Elevato	Caso 13 2 classi n=15 c=0	Caso 14 2 classi n=30 c=0	Caso 15 2 classi n=60 c=0

(3) Le analisi genetiche mi permettono di studiare i micro in base ai loro genomi. Sono analisi più recenti, da quando si sono sviluppate le tecniche adeguate (anni '80). Le diverse tipologie sono:

a. profilo cromosomico
Permette di individuare il n° di cromosomi e le loro dimensioni. Nell'uomo è usata n^H per fini diagnostici (permette di identificare la trisomia 21) ma è usato anche sui micro, come sui lieviti (n^H per fini tassonomici).

b. DNA fingerprinting
Si frammenta il DNA così da ottenere frammenti che risultano tipici di quel organismo

c. presenza di tratti di DNA specifici **PCR**
Non ricerco il micro, ma ricerco un frammento tipico di DNA di quel micro in quanto se questo frammento è presente significa che c'è anche il micro.

d. determinazione di sequenze nucleotidiche specifiche
Mi permettono di leggere il genoma ed è la via maestra per identificare i batteri, n^H osservando la sequenza nucleotidica del RNA ribosomale.

Le diverse fasi di una analisi genetica tipo sono:

> isolamento del micro: può essere fatto come no, cioè posso estrarre e coltivarlo in coltura pura oppure posso analizzare direttamente un campione di alimento.

> estrazione del DNA o RNA: lo faccio con reazioni chimico-enzimatiche e l'ordine di grandezza con cui si lavora sono i µl. Il DNA c'è sempre, che il micro sia vivo o morto, mentre RNA presente solo quando la cellula metabolizza quindi quando il micro è vivo. Sarebbe più utile analizzare allora l'RNA ma questo ha vita breve, è difficile gestirlo e quindi si analizza il DNA.

> trattamento enzimatico: si usano enzimi di restrizione per tagliare il DNA

> visualizzazione del risultato: il risultato ottenuto è qualitativo (micro c'è o no) ed è ottenuto n^H con gel elettroforesi

↓

sostanze migrano all'interno di un campo elettrico e la loro velocità è proporzionale al peso molecolare o alle dimensioni. Si ha una matrice gelatinosa, detta gel, costituita da polisaccaridi cm agarosio, che presenta dei microcanali dove deposito la soluzione da analizzare. Si copre il tutto con una soluzione salina, detta tampone di corsa, e si fa passare la corrente (50-100 volt). Si crea così un campo elettrico che va dal polo - al polo + e, poiché il DNA è carico negativamente, si sposta e lo fa con una velocità tanto minore quanto maggiori sono le dimensioni del frammento, così come più piccoli sono i frammenti più si muovono velocemente. I frammenti si misurano a nucleotidi (= a paia di basi). Nella soluzione inserita nel gel si mette anche un colorante per vedere che l'elettroforesi procede ma cmq non riesco a vedere il DNA. Per fare ciò devo sottoporre il gel a luce ultravioletta così che i fluorofori presenti nel DNA si eccitino permettendo di vedere i diversi frammenti.

N.B. Non posso ricercare **TUTTO** con le analisi genetiche, posso trovare solo ciò che è legato al DNA quindi non trovo tossine, micotossine, sostanze non prodotte dai micro...

L'analisi genetica più usata è l'amplificazione di DNA attraverso la reazione di **PCR**

↓

PCR = polymerase chain reaction = reazione a catena della polimerasi.
Ideata nel '83 da Mullis, è una reazione enzimatica ripetuta per più volte che avviene a carico del DNA e il suo scopo è quello di produrre un elevato n° di copie di uno specifico frammento di DNA. Questa analisi può avere fini:

- tassonomici: identificazione dei micro
- diagnostici: ricerca di determinati ceppi, di determinati patogeni, analisi forensi (quelle attuate sulle scene del crimine quando si trova qualche frammento di DNA), analisi della paternità e rilevazione OGM (ricerco il gene modificato)
- preparatori: per attuare il sequenziamento del DNA

1. Per attuarla serve un termociclatore = piccolo termostato con 2 caratteristiche:
   - può variare la T in tempi rapidissimi
   - deve mantenere la T in modo molto preciso
2. Serve poi un frammento di DNA da amplificare ← tutto ciò è presente in kit commerciali
3. serve enzima DNA-polimerasi (enzima che serve a cellule per replicare il DNA) termostabile, detta **Taq**, che lavora per qualche min a 100°C, T aggiunta nel processo.

N.B. Gli enzimi sono indicati da 3 lettere che indicano le iniziali del micro da cui sono stati isolati (1° lettera per genere, 2° e 3° per specie). In questo caso Thermus aquaticus, micro ipertermofilo che vive nelle acque termali

4. servono singoli nucleotidi per andare a costruire le copie
5. servono primer specifici

piccoli frammenti di DNA indispensabili in quanto la DNA-polimerasi non è capace di lavorare a partire da DNA a singolo filamento, ha bisogno di un frammento iniziale a doppio filamento per partire a duplicare. Questi frammenti a doppio filamento sono i primer e proprio per questa caratteristica dell'enzima posso decidere io da che punto l'enzima parte a duplicare perché ciò dipende da dove si posizionano i primer.
Una volta nota la sequenza del frammento che voglio amplificare devo selezionare i primer e lo faccio considerando le sequenze di basi ai margini del frammento.
Poiché la DNA-polimerasi lavora solamente in direzione 5'→3' un primer sarà rovescio della sequenza

5'...CCTGAT CAATCGATCGGATCGATCGAATCGATCGGATGATAGATGGAT AGATC... 3'
3'...GGACTA GTTAGCTAGCCTAGCTAGCTTAGCTAGCCTACTATCTACCT ATCTAC...5'

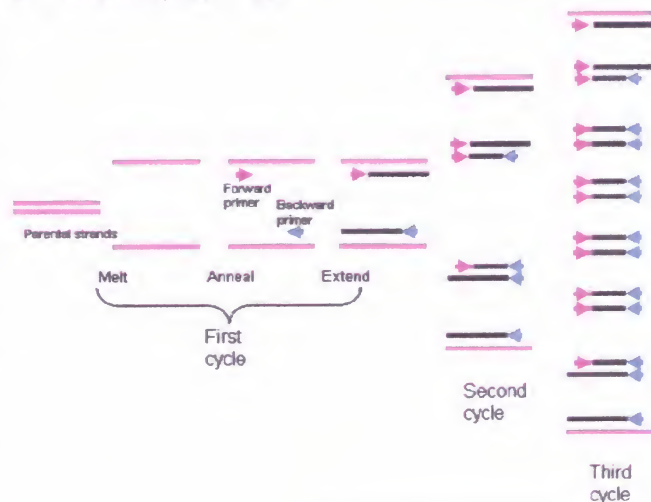
frammento che voglio replicare

primer filamento 1: CCTGAT
primer filamento 2: CATCTA (rovescio perché devo guardare le estremità 5')
N.B. Solitamente i primer sono lunghi una ventina di basi
Il filamento superiore funge da stampo per il primer sotto, il filamento sotto invece funge da stampo per il primer sopra. Le DNA polimerasi sanno dove partire ma non sanno dove finire quindi a partire dal primer replicano tutto il filamento. Questo si risolve con la seconda polimerizzazione dove il filamento superiore funge da stampo per il primer sotto: questo filamento stampo allora inizia con il primer sotto e finisce con il primer sopra!! La stessa cosa vale per l'altro filamento

Il ciclo di amplificazione si basa su 3T:
> T = 95-96 °C : T raggiunta in pochi secondi e determina la denaturazione del DNA = apertura delle due eliche. Questa T è mantenuta per pochi secondi.
> T di appaiamento o annealing = 60-70 °C : T a cui il DNA tende a richiudersi però si attaccano i primer e ciò permette l'inizio del lavoro della polimerasi. T per pochi secondi.
> T di polimerizzazione o di estensione = 70-72 °C : è la T ottimale per il lavoro della polimerasi, che viene mantenuta per 1-2 minuti così che si sintetizzi il filamento copia complementare.

Alla fine di questo ciclo si sono ottenuti 2 filamenti di DNA e il ciclo si ripete diverse volte per ottenere un n° di filamenti pari a $2^{n° cicli}$.
Solitamente un ciclo dura 5 min e solitamente si attuano 30-35 cicli. Quindi se parto da 1 filamento ne ottengo $2^{30} \sim 10^9$ = 1 miliardo di copie!!!!
PCR multiplex = si sono inseriti più primer per isolare + frammenti.

Ciclo termico di amplificazione PCR		
Ciclo 1 1X	94 °C	5 sec
Ciclo 2 35X	94 °C	30 sec
	54 °C	30 sec
	72 °C	1 min 30 sec
Ciclo 3 1X	72 °C	5 sec
Ciclo 4 1X	15 °C	

FUNZIONAMENTO PCR

④ Le analisi immunoenzimatiche sono molto utilizzate non solo in campo alimentare ma n[H] in qll medico.
Il test più utilizzato è quello ELISA (elaisa)

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. Si basa sull'azione associata di enzimi e anticorpo: si ha un anticorpo specifico per la ricerca di una determinata sostanza e se questa è presente l'anticorpo vi si attacca. Si utilizza poi un enzima coniugato = legato all'anticorpo e per evidenziare che l'anticorpo si è legato alla sostanza si usa una reazione colorimetrica. Noi forniamo un reagente incolore, costituito solitamente da due molecole che se rimangono unite non danno colore, e questo risulta specifico per l'enzima che abbiamo legato all'anticorpo. L'enzima riconosce il reagente divide le sue due unità e ciò dà colore alla molecola. Si distinguono due principali tipologie:

A-TEST COMPETITIVO

Si utilizzano piastre da microtitolazione e in ogni pozzetto vengono adese sul fondo tante molecole della tossina che sto cercando. Si versa nei pozzetti il liquido di campione da testare e poi la soluzione che contiene il coniugato (enzima + anticorpo). L'anticorpo si lega alle tossine presenti, sia a quelle presenti sul fondo sia a quelle eventualmente presenti nel campione. Si lava via il liquido dai pozzetti e i casi che si possono presentare sono due:

- se si hanno tanti anticorpi attaccati alle tossine sul fondo del pozzetto, significa che non vi erano molte tossine in soluzione quindi gli anticorpi si legano a quelle sul fondo;
- se si hanno pochi anticorpi attaccati alle tossine sul fondo significa che vi erano molte tossine nel campione e quindi gli anticorpi si sono legati alle molecole in soluzione.

Fino a qui è la parte immunologica del test mentre la successiva è quella enzimatica: si va ad inserire nei pozzetti un reagente incolore specifico per l'enzima presente, a cui si lega rompendosi e dando colore: se c'è molto colore significa che vi sono molti enzimi quindi molti anticorpi sul fondo e ciò dimostra che vi era poca tossina nell'alimento. Se c'è poco colore, invece, significa che vi sono pochi enzimi, quindi pochi anticorpi quindi molta tossina nell'alimento.
Questo è un test sia qualitativo (c'è o no la tossina) che quantitativo.

posso determinare quanta tossina c'è nell'alimento in base al colore costruendo una curva di taratura: prendo una dose nota di tossina e vado a diluire diverse volte osservando i diversi colori che risultano. Questo mi permette di determinare il legame, la funzione che lega la quantità di tossina presente con l'intensità di colore.

Questo test è detto competitivo in quanto le tossine presenti nell'alimento e quelle presenti sul fondo competono per l'aggancio all'anticorpo.

B- TEST A DOPPIO ANTICORPO

Detto anche "sandwich", utilizza anch'esso piastre da microtitolazione ma in questo caso sul fondo dei pozzetti vengono fissati degli anticorpi. Viene inserito il liquido di campione da analizzare e se vi sono tossine queste si legano agli anticorpi sul fondo. Lavo via tutto e vado ad aggiungere anticorpi, che in questo caso sono coniugati, i quali andranno ad attaccarsi alle tossine formando tipo un sandwich (anticorpo-tossina-anticorpo). Si lava via di nuovo e si inserisce il reagente incolore che va ad attaccarsi all'enzima coniugato dando colore. In questo test si ha che:

- più colore c'è più gli enzimi hanno lavorato, quindi più anticorpi coniugati vi sono perciò più tossine sono presenti sul fondo del pozzetto e quindi sul mio campione;
- meno colore c'è, meno gli enzimi hanno lavorato, quindi meno anticorpi coniugati vi sono perciò meno tossine vi sono nel campione.

Un'altra importante analisi immunoenzimatica è il test latex agglutination LAT

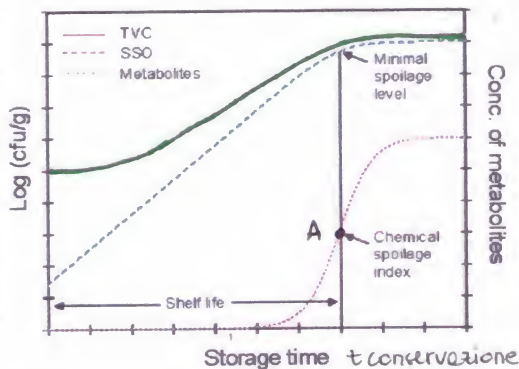
vi sono delle microsfere di lattice su cui sono fissati gli anticorpi. Il test prevede di mescolare una goccia del liquido contenente le microsfere con una goccia del liquido da analizzare. Se nel campione è presente l'antigene specifico per gli anticorpi fissati nel lattice inizia dopo pochi secondi un fenomeno di agglutinazione, che prevede appunto la formazione di agglomerati. Questo è un test qualitativo e anni fa veniva utilizzato per determinare il gruppo sanguigno. In laboratorio noi lo abbiamo usato per identificare la tossina dello S. aureus

DETERIORAMENTO DEGLI ALIMENTI

o food spoilage, è un problema molto grave, che porta alla perdita di ~1/4 della produzione mondiale per l'azione dei micro!

D: deterioramento: modifica delle caratteristiche organolettiche dell'alimento (ciò non è **MAI** dovuto a **PATOGENI!!**) che lo rendono inaccettabile al consumatore (perché non ha le caratteristiche che si aspetta, non perché gli faccia male) o cmq inadatto alla vendita o alla somministrazione.

Il deterioramento può avere diverse cause:
- fisica: es: essiccamento pane
- chimica: es. ossidazione della mela (detto imbrunimento non enzimatico
- biochimica: le molecole si modificano a seguito di una azione enzimatica e questo enzima può essere esogeno (per esse prodotto dai micro) o endogeno (se già presente nell'alimento). es: irrancidimento
- microbiologica: dovuta all'azione dei micro. I micro deterioranti sono più numerosi dei patogeni negli alimenti, in quanto il loro n° non è controllato, non vi è un limite di legge da rispettare come per i patogeni, e oltre a ciò la biodiversità è maggiore, vi sono moltissime specie diverse. Le categorie di micro deterioranti più importanti sono:
  - muffe
  - lieviti
  - batteri: quelli più importanti sono:
    - + enterobatteriace e coliformi
    - + bacelli gram −, come quelli del genere Pseudomonas
    - + gram + sporigeni: come Bacillus e Clostridium
    - + altri gram + come generi Brochothrix, Micrococcus
    - + batteri lattici

Il deterioramento è legato allo sviluppo dei micro (per esempio se vedo muffe o colori strani) e a determinate sostanze prodotte dal micro (e in particolare + si sviluppa + lavora). È importante allora comprendere la dinamica con cui il micro cresce:

- ☐ TVC = total vitable count (carica microbica totale)
- ☐ quantità di micro alteranti
- ☐ attività microbica: viene sempre attuata dai micro ma viene percepita a partire da un certo momento (punto A), e ciò avviene quando i micro raggiungono un certo livello nell'alimento.

Anche gli alteranti possono essere diminuiti applicando la teoria dei molti ostacoli, ma essi risultano più resistenti quindi si devono utilizzare trattamenti più drastici. Questi trattamenti possono però alterare le caratteristiche del mio prodotto e quindi spesso si cerca di evitare ciò attuando solamente i trattamenti necessari per eliminare i micro patogeni. Poiché permangono i micro deterioranti si dovrà però diminuire la shelf-life.

Il deterioramento degli alimenti dipende molto da **T** e in particolare + T + sviluppo micro e + attività. La T mi determina allora la shelf-life e gli alimenti possono essere distinti in:
- alimenti altamente deperibili
- alimenti non altamente deperibili

→ distinti in base alle caratteristiche intrinseche degli alimenti
- > Aw: più H_2O in alimento più favorito deterioramento
- > pH: più pH più sviluppo micro e quindi più deterioramento
- > struttura fisica dell'alimento: se è stato manipolato è più facile che sia venuto a contatto con i micro

Gli effetti del deterioramento sono:
- variazione aspetti organolettici, come colore, odore, consistenza
- formazione di patine batteriche, dette slime
- fuoriuscita di liquidi
- accumulo di gas (gonfia lattine) o di schiuma (dopo fermentazione attuata dai micro, come nella marmellata che bolle).

le cause delle alterazioni degli alimenti sono invece:
> crescita dei micro
> produzione da parte dei micro di enzimi extra o intracellulari

possono svolgere diverse funzioni:
- attività proteolitica (da putrefazione carne ma è fondamentale nei formaggi)
- attività lipolitica (da irrancidimento burro ma è fondamentale nei salami)
- attività pectinolitica: pectine sono polisaccaridi che addensa e se rotti si perde consistenza
- attività fermentativa: importante in alcuni alimenti ma non voluta in tanti altri
- sintesi polisaccaridi: per costruirsi la capsula

I batteri sono i principali agenti di alterazione perché sono i primi che si sviluppano (xchè + di duplicazione + breve) ma, negli alimenti con Aw e pH bassi, né i batteri né i lieviti si sviluppano ma lo fanno le muffe. Il confezionamento in anaerobiosi limita lo sviluppo di muffe e di batteri aerobi stretti ma non blocca i micro anaerobi.
È necessaria la moltiplicazione dei micro nell'alimento in quanto per vedere una alterazione i micro devono raggiungere un "livello di comparsa delle alterazioni". Per batteri e lieviti questo livello è di $\sim 10^7$ cellule per gr (o per ml o per cm^2 di alimento) e il tempo che gli serve per raggiungere questo livello dipende da T, in particolare + T + sviluppo − tempo.

I micro alteranti vivono in condizioni in cui i patogeni non si sviluppano e infatti vi sono micro alteranti:
- psicrofili: vive a T < 10°C e possono essere sia aerobi che anaerobi
- termodurici: resiste a T > 65°C (resiste nel latte pastorizzato)
- termofili: crescono e si moltiplicano a T elevate, 50 < T < 60°C perciò si sviluppa in alimenti che subisce trattamenti termici elevati
- acido-tolleranti: si sviluppano a pH < 4,6

→ dire allora che un alimento non si può alterare è impossibile proprio perché i micro alteranti presentano una ecologia estrema

Le cinque categorie di batteri alteranti sono:

1 - aerobi GRAM −
Tipicamente legati all'alterazione di prodotti refrigerati e il più importante è Pseudomonas. Determinano marciumi, irrancidimento, cattivi odori e colpiscono tutte le tipologie di alimento. Sono facilmente eliminabili con un trattamento termico e sono molto sensibili al sale.
Fa parte del genere pseudomonads, molto eterogeneo. Sono bastoncelli, gram −, aerobi stretti quindi catalasi e ossidasi +. È mobile per la presenza di flagelli ed è ubiquitario - presente dappertutto. Il più importante è lo P. fluorescens, così detto perché produce pigmenti fluorescenti (mozza blu).
È mesofilo con spiccate tendenze psicrotrofe, e per questo si sviluppa bene nei cibi refrigerati, ed è molto sensibile a Aw e pH bassi. Sono grandi produttori di enzimi, anche termoresistenti.

2 - coliformi
Batteri di origine intestinale, e per questo contaminano nH le carni, e appartengono alla famiglia delle Enterob-. Sono quindi anaerobi facoltativi, mesofili (NON si sviluppano in frigo), dalla fermentazione producono gas e polisaccaridi che comportano filante (= l'alimento liquido assume una viscosità simile all'olio). Colpiscono la carne sottovuoto e salata, i formaggi, gli ortaggi e le uova, dando colori e odori anomali, e poiché non sono termoresistenti sono indicatori una contaminazione post trattamento.

3 - GRAM + sporigeni
Sono spore di Bacillus e Clostridium che sono termoresistenti. Comportano negli alimenti produzione di gas, coagulazione, amarezza, colori scuri e gli alimenti più colpiti sono le conserve in scatola. Questo in quanto le spore sono più termoresistenti di quelle del C. botulinum quindi il processo di sterilizzazione può non eliminarle tutte.

4 - GRAM + non sporigeni
Il principale micro alterante è il Brocothrix, psicrotrofo, anaerobio facoltativo, resistente a bassa Aw, che produce diverse sostanze come diacetile (molecola che dà aroma di burro), acido acetico e acetoino, che danno odori tipici del formaggio.

5 - batteri lattici
Termofili, acidofili (vive bene a pH bassi), sono anaerobi stretti e alcuni aerotolleranti e per questo danno problemi nH per i prodotti sottovuoto o in atmosfera protettiva. In quanto fermentano l'alterazione che provocano è l'acidificazione dell'alimento.

MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

Uso di strumenti matematici, statistici e informatici per studiare quantitativamente ecologia microbica (= parametri che influenzano lo sviluppo dei microbi). Questo mi permette di gestire il rischio biologico, di valutarlo in diverse condizioni, e ciò è importante per determinare la shelf-life del prodotto. Si possono utilizzare diversi modelli:

- statici: rilevo i dati del prodotto solo in un determinato istante, quindi è valido solo in quell'istante
- statici comparati: sono più modelli statici assieme, cioè si vanno a rilevare i dati in diversi istanti e in particolare più istanti verifico più certo è l'andamento del fenomeno nel tempo che ricavo dai grafici. Riusciamo a ricavare l'andamento del fenomeno ma **NON** la dinamica
- dinamici: rappresentano lo stato del sistema in ogni istante in quanto ricavo dai dati raccolti la legge che regola il fenomeno.

La microbiologia predittiva è fatta per casi specifici = micro specifico in uno specifico ambiente con specifiche condizioni. La microbiologia predittiva è attuata secondo diverse fasi:

- seleziono il micro da studiare
- attuo un modello primario: mi descrive lo sviluppo dei micro in quell'ambiente nel tempo. Costruisco quindi una curva di crescita in determinate condizioni che io stabilisco (pH, Aw, T) e che rimangono costanti;
- attuo un modello secondario: insieme di più modelli primari, dove vado a variare le condizioni che avevo stabilito. Faccio quindi variare un parametro e ciò mi permette di verificare la crescita micro nei vari casi. Es: MCT
- attuo un modello terziario: sono dei software che mi permettono di integrare i modelli primari e secondari così da poter ricavare un modello primario con i determinati parametri che voglio. Valutando i diversi modelli primari che posso ottenere applicando diversi parametri posso ricavare quali sono le condizioni migliori per conservare e produrre l'alimen. La difficoltà è che il software si basa su modelli matematici, su matrici di dati che non valgono per tutti gli alimenti e per tutti i micro, ma dovrò ricavarmi un modello per il determinato caso che sto considerando!! Posso ricavare il modello matematico (funzioni dove una variabile indipendente x è messa in relazione con la variabile dipendente y) per il mio caso particolare in diversi modi e, quelli più utilizzati sono:
  - + logistic
  - + Gompertz

  Questi metodi ricavano la funzione secondo diversi parametri, quali:

  A: livello massimo raggiungibile dalla popolazione microbica (è il livello dell'asintoto orizzontale nella curva di crescita)

  μmax: coefficiente retta tangente nel punto di flesso alla curva di crescita. Dipende da velocità massima di crescita dei micro

  λ: punto sull'asse x dove la retta tangente al punto di flesso incontra l'asse. Indica la durata della fase di latenza.

calcolo del modello: calcolo di A, μmax e λ affinché la curva si adatti il più possibile ai dati sperimentali. Si lavora in modo induttivo: ricavo i dati sperimentali nelle condizioni che determino e costruisco la curva di crescita dei micro. La migliore interpolazione, cioè la curva che descrive meglio l'andamento dei dati, è quella con il quadrato (somma) degli scarti minore e la ricavo inserendo nel modello i dati sperimentali così che esso ricavi A, μmax e λ.

RASFF: Rapid Alert System for food and feed
Rapida allerta per gli alimenti destinati all'uomo e agli animali. E' un organo centrale a cui fanno riferimento tutti gli stati UE e che indica tutti i casi di problemi alimentari

IARC: International Agency for Reserching Cancer
Agenzia che indica quali sostanze sono cancerogene. Distingue in particolare in:
- gruppo 1: sostanze sicuramente cancerogene per l'uomo (es: alcol, fumo)
- gruppo 2A: sostanze che molto probabilmente sono cancerogene per l'uomo
- gruppo 2B: sostanze che possono essere cangerogene per l'uomo
- gruppo 3: sostanze che non hanno relazione con il cancro
- gruppo 4: sostanze probabilmente non cangerogene per l'uomo

MCT: microbial challenge test
Procedura sperimentale che serve per determinare il rischio legato al consumo di un alimento. E' un test microbiologico che prevede l'inoculo dei micro sul prodotto e se ne distinguono due tipi:
+ di processo: mi permette di capire quanto il processo attuato può aumentare la sicurezza microbiologica e quindi la shelf-life del prodotto. Per esempio valuto qual'è il miglior trattamento che posso attuare
+ di prodotto: mi permette di osservare come si comportano i micro sull'alimento dopo che questo è uscito dallo stabilimento. Mi permette allora di determinare la shelf-life.

Questo test prevede diverse fasi:
- pianificazione: devo tener conto delle diverse fasi del processo produttivo e dei loro effetti sui micro, del profilo microbiologico delle materie prime e del prodotto finito, i rischi di alterazione e tossinfezione, tipi e caratteristiche dei micro pericolosi e loro capacità di crescita sul mio alimento.
- contamino artificialmente il prodotto con il patogeno che mi interessa e poi guardo il suo sviluppo durante la shelf-life. Devo contaminare il prodotto non con un quantitativo di micro che potrebbe naturalmente avere, ma con un quantitativo superiore, devo applicare le condizioni meno favorevoli che possono avvenire (eccesso micro, T di abuso termico...) così che, se la sicurezza è garantita in questo caso lo sarà anche in tutti gli altri.
- raccolgo i dati e verifico se il micro si è sviluppato durante la shelf-life. Se si è sviluppato significa che l'alimento è un terreno favorevole allo sviluppo microbico e quindi si dovrà rispettare il limite più ristretto (assenza in 25 gr di prodotto), se invece non si sviluppa l'alimento NON è un terreno favorevole e quindi posso applicare il limite di 100 ufc/gr.

ΔG = energia libera = parte di energia totale trasformata in lavoro, nelle condizioni di T e P costanti. E' l'energia utilizzata dalla cellula.

micro vivi ma non coltivabili = micro capaci di dare una progenie solamente nell'ambiente naturale in cui vivono.

La costante di equilibrio keq della dissociazione dell'H_2O è pari a:

$k = \frac{[H^+]\cdot[OH^-]}{[H_2O]^2}$ $2H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$ inglobando $[H_2O]^2$ nella costante $keq\cdot[H_2O]^2 = [H^+]\cdot[OH^-]$

Kw = costante di dissociazione dell'acqua, che dipende sì da T
Poiché a 25°C $kw = 1\cdot10^{-14}$ e poiché nell'acqua pura $[H^+]=[OH^-]$, allora
$[H^+]\cdot[OH^-] = 1\cdot10^{-14}$
$[H^+] = [OH^-] = 1\cdot10^{-7}$

rinofaringe: parte superiore della faringe, localizzata dietro il naso (le narici porta aria alla rinofaringe) e che presenta due aperture laterali che portano all'orecchio.